

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 06 April 2001 (06.04.01)	
International application No. PCT/EP00/06905	Applicant's or agent's file reference 20393P WO
International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 19 July 1999 (19.07.99)
Applicant WILHELM, Olaf et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 14 February 2001 (14.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
D-81635 München
ALLEMAGNE

22. OKT. 2001

Fach:
Patentanwälte

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 19.10.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
20393P WO

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/06905

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
19/07/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
19/07/1999

Anmelder
WILEX AG et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Gallego, A

Tel. +49 89 2399-8102



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



22. OKT. 2001
Patentanwalte

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 20393P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06905	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K7/00		
Anmelder WILEX AG et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 14/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 19.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 pmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Jenn, T Tel. Nr. +49 89 2399 7348 

I. Grundlag des Berichts

1. Hinsichtlich der Bestandteile der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-11 mit Telefax vom 26/07/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/12-12/12 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06905

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung.

☒ Ansprüche Nr. 9.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 9 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
 - ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 - ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06905

V. Begründet F stst llung nach Artik l 35(2) hinsichtlich der N uh it, der erfinderischen Tätigk it und d r gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung di s r F stst llung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8,10,11
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden **Anspruch 9** gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: WO 98 46632 A, in der Anmeldung erwähnt (Seite 4, Zeile 1)

1. Das Dokument **D1** wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart (die Verweise in Klammern beziehen sich auf dieses Dokument) Peptid-Verbindungen, die Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor darstellen (Zusammenfassung). **D1** offenbart insbesondere das synthetische Peptid cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ (Seite 18, Zeile 11, und Figur 3, Seite 3/5 der Zeichnungen).

2. Der Gegenstand des Anspruchs 1 **unterscheidet** sich daher von dieser bekannten Verbindung dadurch, daß der Aminocarbonsäurerest X²¹ ein Asp, Glu, Dap, Dab, D-Pen, Alg, Orn, Lys oder D-Cys ist.

3. Der Gegenstand den **Anspruch 1-11** ist somit **neu** (Artikel 33 (2) PCT).

4. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende **Aufgabe** kann somit darin gesehen werden, alternative Verbindungen, die bessere Urokinaserezeptorantagonisten als $\text{cyclo}^{21,29}[\text{Cys21,29}]\text{uPA}_{21-30}$ sind, zur Verfügung zustellen.

5. Die in **Anspruch 1** der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung beruht aus den folgenden Gründen auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT):

5.1 Dokument **D1** schlägt eine Verbindung vor die die Strukturformel (I) der Anmeldung hat (Anspr. 1), worin:

X^{21} D-Cys bedeutet (S. 4, Z. 31, und S. 7, Z. 1-2 and 7), und/oder

X^{22} Asn bedeutet (S. 5, Z. 2), und/oder

X^{23} Lys bedeutet (S. 5, Z. 8), und/oder

X^{24} Tyr bedeutet (S. 5, Z. 12), und/oder

X^{25} Phe bedeutet (S. 5, Z. 13), und/oder

X^{26} Ser bedeutet (S. 5, Z. 17), und/oder

X^{27} Asn bedeutet (S. 5, Z. 2), und/oder

X^{28} Ile bedeutet (S. 5, Z. 23), und/oder

X^{29} Cys bedeutet (S. 4, Z. 31), und/oder

X^{30} Trp bedeutet (S. 5, Z. 27), und

Y ein Spacer bedeutet (S. 4, Z. 19 und Anspr. 1), worin

m und n 0 oder 1 bedeuten (S. 4, Z. 20 und Anspr. 1), worin

die monomeren Bausteine über $-\text{NR}^1\text{CO}-$ oder $-\text{CONR}^1-$ Bindungen verknüpft sind (S. 4, Z. 21-24 und Anspr. 1), worin

mindestens 2 der Aminosäurereste der erfindungsgemäßen Peptide eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen (S. 5, Z. 30-35, und Anspr. 4 und 5), und worin

X^{21} bis X^{30} durch einen Aminosäurerest (Anspr. 2, 3 und siehe von Seite 4 Zeile 29 bis Seite 5, Zeile 35) ersetzt ist (keiner der von X^{21} bis X^{30} monomeren Baustein ist wie in der Anmeldung geschrieben).

5.2 Da die Verbindungen der Anmeldung in **D1** nicht suggeriert sind, und da die Verbindungen der Anmeldung bessere Urokinaserezeptorantagonisten als $\text{cyclo}^{21,29}[\text{Cys21,29}]\text{uPA}_{21-30}$ sind (Siehe die Anmeldung: Abbildung 2: die IC_{50} -Werte,

von 78 bis 550 nM, sind viel besser als der IC_{50} -Wert vom synthetischen Peptid cyclo^{21,29}[Cys_{21,29}]uPA₂₁₋₃₀ [Seite 4, Zeilen 5-12 und von Seite 16, Zeile 25 bis Seite 17, Zeile 3: IC_{50} -Wert ist 2260 nM]), hat der Gegenstand des Anspruchs 1 eine erfinderische Tätigkeit.

5.3 Die Ansprüche 2-11 sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit.

6. Gewerbliche Anwendbarkeit (Artikel 33(4) PCT):

Die Ansprüche 1-8 und 10-11 genügen den Kriterien des Artikels 33(4) PCT hinsichtlich ihrer gewerblichen Anwendbarkeit.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Die Beschreibung (Siehe z.B. Seite 5, Zeile 10: X²¹ ist "Pen") steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen (X²¹ kann in Anspr. 1 z.B. nicht "Pen" sein). Dasselbe gilt auch für die Abbildungen (Abbildung 2: Nle28, Arg23, Pen29, Gln22, Phe24, Phe30 stehen nicht in Einklang mit den Ansprüchen).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

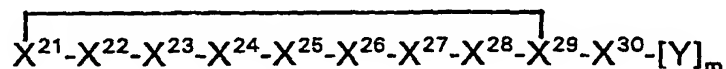
1. Der in den **Ansprüchen 1, 2 und 3** benutzte Ausdruck "einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰" ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung der betreffenden technischen Merkmale im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT):

26. Juli 2001

PCT/EP00/06905
20392P WO/WWJPpu

Ansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin $X^{21}-X^{30}$ monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung $X^{21} = \text{D-Cys}$, $X^{22} = \text{Asn}$, $X^{23} = \text{Lys}$, $X^{24} = \text{Tyr}$, $X^{25} = \text{Phe}$, $X^{26} = \text{Ser}$, $X^{27} = \text{Asn}$, $X^{28} = \text{Ile}$, $X^{29} = \text{Cys}$ und $X^{30} = \text{Trp}$ abgeleitet sind, Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -CONR¹- oder -NR¹CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R¹ jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, ist mit der Maßgabe daß mindestens einer der Aminosäurereste $X^{21}-X^{30}$ der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebenen Aminosäurereste ersetzt ist:

X^{21} : Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure (Dab), D-Penicillanin (D-Pen), Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;

X^{22} : Asp, Glu;

X^{23} : Dab, Dap, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);

X^{24} : Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal) Cha (Cyclohexylalanin);

X^{25} : Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

23

- X²⁶: Val;
X²⁷: Asp, Glu;
X²⁸: Cha, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tl), α -
Aminoisobuttersäure (Aib);
X²⁹: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, D-Pen, Orn, Lys;

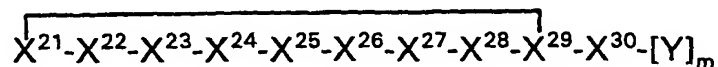
2. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- X²¹: D-Pen;
X²³: Dap, Dab, Cit, Hci, Nle, His;
X²⁴: Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁷: Asp;
X²⁸: Val, Cha.

3. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- X²¹: D-Pen;
X²³: Dab, Nle, Cit, Hci;
X²⁴: 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁸: Cha.

4. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin X^{21} - X^{30} monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung X^{21} = D-Cys, X^{22} = Asn, X^{23} = Dap, Dab oder Nle, X^{24} = Tyr, X^{25} = Phe, X^{26} = Ser, X^{27} = Asn, X^{28} = Ile, X^{29} = Cys und X^{30} = Trp abgeleitet sind, Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -CONR¹- oder -NR¹CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R¹ jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon.

5. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{22} , X^{23} , X^{24} , X^{25} , X^{26} , X^{27} , X^{28} und X^{30} eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.
6. Verbindungen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{24} , X^{25} , X^{28} und X^{30} die gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält.

8. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines uPAR-Antagonisten.
9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung.
10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Targetingvehikels für uPAR-exprimierende Zellen.
11. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Angiogenese-Inhibitors.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

8

Applicant's or agent's file reference 20393P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06905	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 19 July 1999 (19.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C0K7/00		
Applicant WILEX AG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 14 February 2001 (14.02.01)	Date of completion of this report 19 October 2001 (19.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06905

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-21, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-11, filed with the letter of 26 July 2001 (26.07.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/12-12/12, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06905

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 9

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 9
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See annex

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box III

There are no uniform criteria against which the industrial applicability of **Claim 9** can be assessed for all the PCT Contracting States. Patentability may also depend on the wording of the claims. For example, the European Patent Office does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound. It may, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the preparation of a drug for a new medical application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8, 10, 11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1: WO-A-98/46632 (cited in the application (page 4, line 1))

- Document **D1**, which is considered to be the prior art closest to the subject matter of Claim 1, discloses (the references in parentheses are to D1) peptide compounds which act as inhibitors to prevent the bonding of urokinase to the urokinase receptor (see the abstract). More particularly, **D1** discloses the synthetic peptide cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ (page 18, line 11, and Figure 3 on page 3/5 of the drawings).
- The subject matter of Claim 1 of the present application **differs** from this known compound in that the amino carboxylic acid group X²¹ is Asp, Glu, Dap, Dab, D-Pen, Alg, Orn, Lys or D-Cys.
- The subject matter of **Claims 1-11** is therefore **novel** (PCT Article 33(2)).
- The **problem addressed** by the invention can thus be seen as that of providing alternative compounds which are more efficient than cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ as urokinase receptor antagonists.

5. The solution proposed in **Claim 1** involves an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

5.1 **D1** proposes a compound with the structural formula (I) as per the present application (Claim 1), wherein:

- X^{21} is D-Cys (page 4, line 31; page 7, lines 1-2 and 7, and/or
- X^{22} is Asn (page 5, line 2), and/or
- X^{23} is Lys (page 5, line 8), and/or
- X^{24} is Tyr (page 5, line 12), and/or
- X^{25} is Phe (page 5, line 13), and/or
- X^{26} is Ser (page 5, line 17), and/or
- X^{27} is Asn (page 5, line 2), and/or
- X^{28} is Ile (page 5, line 23), and/or
- X^{29} is Cys (page 4, line 31), and/or
- X^{30} is Trp (page 5, line 27), and
- Y is a spacer (page 4, line 19, and Claim 1), wherein
- m and n are 0 or 1 (page 4, line 20, and Claim 1), wherein
- the monomer building blocks are joined by $-NR^1CO-$ or $-CONR^1-$ bonds (page 4, lines 21-24, and Claim 1), wherein
- at least two of the amino acid residues in the peptides according to the invention have the same side chain as an amino acid in the same position in the native uPA sequence (page 5, lines 30-35, and Claims 4 and 5), and wherein
- X^{21} to X^{30} are replaced by an amino acid residue (Claims 2 and 3; see also page 4, line 29 - page 5, line 35) (none of the monomer building blocks X^{21} to X^{30} are as described in the present application).

5.2 Since the compounds described in the present application are not suggested by **D1**, and since they are more efficient than cyclo^{21,29}[Cys_{21,29}]uPA₂₁₋₃₀ as urokinase receptor antagonists (see Figure 2 of the present application; the IC₅₀ values from 78 to 550 nM are considerably better than the IC₅₀ values of the synthetic peptide

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ (page 4, lines 5-12, and page 16, line 25 - page 17, line 3; the IC₅₀ value is 2260 nM)), the subject matter of Claim 1 involves an inventive step.

5.3 Claims 2-11 are dependent on Claim 1 and therefore also meet the PCT requirement in respect of inventive step.

6. Industrial applicability (PCT Article 33(4))

Claims 1-8, 10 and 11 meet the requirement of PCT Article 33(4) in respect of industrial applicability.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description is not consistent with the claims (PCT Rule 5.1(a)(iii)). For example, in line 10 on page 5 of the description, X²¹ is Pen, yet in Claim 1 X²¹ cannot be Pen. The same applies to the drawings (Nle28, Arg23, Pen29, Gln22, Phe24 and Phe30 in Figure 2 are inconsistent with the claims).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/06905

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

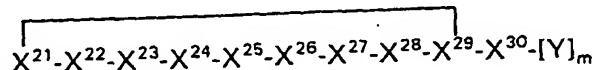
The phrase "one of the amino acid residues X^{21} to X^{30} " in **Claims 1, 2 and 3** is vague and equivocal, and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature referred to. Consequently the definition of the subject matter of the claim is not clear (PCT Article 6).

Replaced
by art. 34
Amendment

- 22 -

Claims

1. A compound of the general structural formula (I):



5

wherein $X^{21}-X^{30}$ are monomeric building blocks, preferably aminocarboxylic acid residues and are derived from a structure in which X^{21} = D-Cys, X^{22} = Asn, X^{23} = Lys, X^{24} = Tyr, X^{25} = Phe, X^{26} = Ser, X^{27} = Asn, X^{28} = Ile, X^{29} = Cys and X^{30} = Trp, Y is a spacer and m is 0 or 1, and the monomeric building blocks are linked via $-\text{CONR}^1$ or $-\text{NR}^1\text{CO}$ bonds, in which R^1 in each case independently is hydrogen, methyl or ethyl, and pharmaceutically acceptable salts and derivatives thereof, with the proviso that at least one of the amino acid residues $X^{21}-X^{30}$ of the lead structure is replaced by one of the amino acid residues listed below:

10

15

20

X^{21} : Asp, Glu, 2,3-diaminopropionic acid (Dap), 2,4-diaminobutyric acid (Dab), penicillamine (Pen), D-Pen, allylglycine (Alg), ornithine (Orn), Lys;

25

X^{22} : Gln, Asp, Glu;

X^{23} : Orn, Dap, Arg, His, citrulline (Cit), homocitrulline (Hci), norleucine (Nle);

X^{24} : Phe, homophenylalanine (Hph), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (Tic), thienylalanine (Thi), Trp, phenylglycin (Phg), 1-naphthylalanine (1-Nal), 2-naphthylalanine (2-Nal), Cha (cyclohexylalanine);

30

X^{25} : Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

35

X^{26} : Thr, Val, homoserine (Hse);

X^{27} : Gln, Asp, Glu;

X²⁸: Val, Leu, 2-aminobutyric acid (Abu), tert-leucine (Tle), norvaline (Nva), Nle, α-aminoisobutyric acid (Aib);

X²⁹: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;

X³⁰: Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, octahydroindolyl-2-carboxylic acid (Oic), His, thiazolylalanine (Thia), Phg, tryptamine (Trp-NH₂).

2. The compound as claimed in claim 1, **characterized in that** at least one of the amino acid residues X²¹-X³⁰ of the lead structure has one of the meanings listed

below:

X²¹: D-Pen;

X²²: Gln;

X²³: Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;

X²⁴: Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

X²⁵: Thi;

X²⁷: Asp;

X²⁸: Nle, Val, Cha;

X²⁹: Pen;

X³⁰: Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia, Trp-NH₂.

3. The compound as claimed in claim 1, **characterized in that** at least one of the amino acid residues X²¹-X³⁰ of the lead structure has one of the meanings listed below:

X²¹: D-Pen;

X²³: Arg, Nle, Cit, Hci;

X²⁴: Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

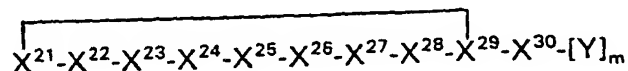
X²⁵: Thi;

X²⁸: Nle, Cha;

X²⁹: Pen;

X³⁰: Trp-NH₂.

4. A compound of the general structural formula (I):



- 5 wherein $X^{21}-X^{30}$ are monomeric building blocks, preferably aminocarboxylic acid residues and are derived from a structure in which X^{21} = D-Cys, X^{22} = Asn, X^{23} = Lys, X^{24} = Tyr, X^{25} = Phe, X^{26} = Ser, X^{27} = Asn, X^{28} = Ile, X^{29} = Cys and X^{30} = Trp, Y is a
10 spacer and m is 0 or 1, and the monomeric building blocks are linked via $-\text{CONR}^1$ or $-\text{NR}^1\text{CO}$ bonds, in which R^1 in each case independently is hydrogen, methyl or ethyl, and pharmaceutically acceptable salts and derivatives thereof,
15 with the proviso that at least one of the amino acid residues $X^{21}-X^{30}$ of the lead structure is replaced by a non-proteinogenic amino acid residue.
- 20 5. The compound as claimed in claim 4,
characterized in that
it has a higher protease stability compared with the lead structure.
- 25 6. The compound as claimed in either of claims 4 and 5,
characterized in that
 Lys^{23} is replaced by a non-proteinogenic amino acid.
- 30 7. The compound as claimed in any of the preceding claims,
characterized in that
at least 2 of the amino acid residues X^{22} , X^{23} , X^{24} ,
35 X^{25} , X^{26} , X^{27} , X^{28} and X^{30} have the same side chain as an amino acid at the same position in the native uPA sequence.

8. The compound as claimed in claim 7,
characterized in that
at least 2 of the amino acid residues X^{24} , X^{25} , X^{28}
and X^{30} have the same side chain as in the native
5 uPA sequence.
9. A pharmaceutical composition, which contains as
active substance at least one compound as claimed
in any of claims 1 to 8, where appropriate
10 together with pharmaceutically common carriers,
excipients or diluents.
10. The use of a compound as claimed in any of
claims 1-8 for preparing a uPAR antagonist.
15
11. The use as claimed in claim 10 for controlling
disorders associated with uPAR expression, in
particular for controlling tumors.
- 20 12. The use of a compound as claimed in any of
claims 1 to 8 for preparing a targeting vehicle
for cells expressing uPAR.
- 25 13. The use of a compound as claimed in any of
claims 1 to 8 for preparing an angiogenesis
inhibitor.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 23 OCT 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 20393P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06905	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K7/00		
Anmelder WILEX AG et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 14/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 19.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Jenn, T Tel. Nr. +49 89 2399 7348 

I. Grundlag des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-11 mit Telefax vom 26/07/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/12-12/12 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06905

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 9.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 9 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
 - ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 - ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06905

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8,10,11
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden **Anspruch 9** gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: WO 98 46632 A, in der Anmeldung erwähnt (Seite 4, Zeile 1)

1. Das Dokument **D1** wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart (die Verweise in Klammern beziehen sich auf dieses Dokument) Peptid-Verbindungen, die Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor darstellen (Zusammenfassung). **D1** offenbart insbesondere das synthetische Peptid cyclo^{21,29}[Cys_{21,29}]uPA₂₁₋₃₀ (Seite 18, Zeile 11, und Figur 3, Seite 3/5 der Zeichnungen).

2. Der Gegenstand des Anspruchs 1 **unterscheidet** sich daher von dieser bekannten Verbindung dadurch, daß der Aminocarbonsäurerest X²¹ ein Asp, Glu, Dap, Dab, D-Pen, Alg, Orn, Lys oder D-Cys ist.

3. Der Gegenstand den **Ansprüche 1-11** ist somit **n u** (Artikel 33 (2) PCT).

4. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende **Aufgabe** kann somit darin gesehen werden, alternative Verbindungen, die bessere Urokinaserezeptorantagonisten als $\text{cyclo}^{21,29}[\text{Cys}_{21,29}\text{uPA}_{21-30}]$ sind, zur Verfügung zustellen.

5. Die in **Anspruch 1** der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung beruht aus den folgenden Gründen auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT):

5.1 Dokument **D1** schlägt eine Verbindung vor die die Strukturformel (I) der Anmeldung hat (Anspr. 1), worin:

X^{21} D-Cys bedeutet (S. 4, Z. 31, und S. 7, Z. 1-2 and 7), und/oder

X^{22} Asn bedeutet (S. 5, Z. 2), und/oder

X^{23} Lys bedeutet (S. 5, Z. 8), und/oder

X^{24} Tyr bedeutet (S. 5, Z. 12), und/oder

X^{25} Phe bedeutet (S. 5, Z. 13), und/oder

X^{26} Ser bedeutet (S. 5, Z. 17), und/oder

X^{27} Asn bedeutet (S. 5, Z. 2), und/oder

X^{28} Ile bedeutet (S. 5, Z. 23), und/oder

X^{29} Cys bedeutet (S. 4, Z. 31), und/oder

X^{30} Trp bedeutet (S. 5, Z. 27), und

Y ein Spacer bedeutet (S. 4, Z. 19 und Anspr. 1), worin

m und n 0 oder 1 bedeuten (S. 4, Z. 20 und Anspr. 1), worin

die monomeren Bausteine über $-\text{NR}^1\text{CO}-$ oder $-\text{CONR}^1-$ Bindungen verknüpft sind (S. 4, Z. 21-24 und Anspr. 1), worin

mindestens 2 der Aminosäurereste der erfindungsgemäßen Peptide eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen (S. 5, Z. 30-35, und Anspr. 4 und 5), und worin

X^{21} bis X^{30} durch einen Aminosäurerest (Anspr. 2, 3 und siehe von Seite 4 Zeile 29 bis Seite 5, Zeile 35) ersetzt ist (keiner der von X^{21} bis X^{30} monomeren Baustein ist wie in der Anmeldung geschrieben).

5.2 Da die Verbindungen der Anmeldung in **D1** nicht suggeriert sind, und da die Verbindungen der Anmeldung bessere Urokinaserezeptorantagonisten als $\text{cyclo}^{21,29}[\text{Cys}_{21,29}\text{uPA}_{21-30}]$ sind (Siehe die Anmeldung: Abbildung 2: die IC_{50} -Werte,

von 78 bis 550 nM, sind viel besser als der IC_{50} -Wert vom synthetischen Peptid cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ [Seite 4, Zeilen 5-12 und von Seite 16, Zeile 25 bis Seite 17, Zeile 3: IC_{50} -Wert ist 2260 nM]), hat der Gegenstand des Anspruchs 1 eine erfinderische Tätigkeit.

5.3 Die Ansprüche 2-11 sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit.

6. Gewerbliche Anwendbarkeit (Artikel 33(4) PCT):

Die Ansprüche 1-8 und 10-11 genügen den Kriterien des Artikels 33(4) PCT hinsichtlich ihrer gewerblichen Anwendbarkeit.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Die Beschreibung (Siehe z.B. Seite 5, Zeile 10: X²¹ ist "Pen") steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen (X²¹ kann in Anspr. 1 z.B. nicht "Pen" sein). Dasselbe gilt auch für die Abbildungen (Abbildung 2: Nle28, Arg23, Pen29, Gln22, Phe24, Phe30 stehen nicht in Einklang mit den Ansprüchen).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

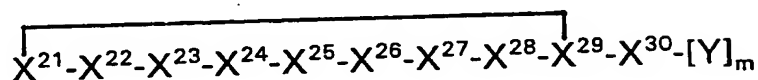
1. Der in den **Ansprüchen 1, 2 und 3** benutzte Ausdruck "einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰" ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung der betreffenden technischen Merkmale im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT):

26. Juli 2001

PCT/EP00/06905
20392P WO/WWJPpu

Ansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin $X^{21}-X^{30}$ monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung $X^{21} = \text{D-Cys}$, $X^{22} = \text{Asn}$, $X^{23} = \text{Lys}$, $X^{24} = \text{Tyr}$, $X^{25} = \text{Phe}$, $X^{26} = \text{Ser}$, $X^{27} = \text{Asn}$, $X^{28} = \text{Ile}$, $X^{29} = \text{Cys}$ und $X^{30} = \text{Trp}$ abgeleitet sind, Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über $-\text{CONR}^1$ - oder $-\text{NR}^1\text{CO}$ -Bindungen verknüpft sind, wobei R^1 jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, ist mit der Maßgabe daß mindestens einer der Aminosäurereste $X^{21}-X^{30}$ der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebenen Aminosäurereste ersetzt ist:

X^{21} : Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diäminobuttersäure (Dab), D-Penicillanin (D-Pen), Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;

X^{22} : Asp, Glu;

X^{23} : Dab, Dap, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);

X^{24} : Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal) Cha (Cyclohexylalanin);

X^{25} : Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

23

- X²⁶: Val;
X²⁷: Asp, Glu;
X²⁸: Cha, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle), α -Aminoisobuttersäure (Aib);
X²⁹: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, D-Pen, Orn, Lys;

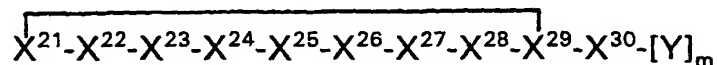
2. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- X²¹: D-Pen;
X²³: Dap, Dab, Cit, Hci, Nle, His;
X²⁴: Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁷: Asp;
X²⁸: Val, Cha.

3. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- X²¹: D-Pen;
X²³: Dab, Nle, Cit, Hci;
X²⁴: 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁸: Cha.

4. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin $X^{21}-X^{30}$ monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung $X^{21} = \text{D-Cys}$, $X^{22} = \text{Asn}$, $X^{23} = \text{Dap}$, Dab oder Nle , $X^{24} = \text{Tyr}$, $X^{25} = \text{Phe}$, $X^{26} = \text{Ser}$, $X^{27} = \text{Asn}$, $X^{28} = \text{Ile}$, $X^{29} = \text{Cys}$ und $X^{30} = \text{Trp}$ abgeleitet sind, Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über $-\text{CONR}^1$ - oder $-\text{NR}^1\text{CO}$ -Bindungen verknüpft sind, wobei R^1 jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon.

5. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{22} , X^{23} , X^{24} , X^{25} , X^{26} , X^{27} , X^{28} und X^{30} eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.
6. Verbindungen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{24} , X^{25} , X^{28} und X^{30} die gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält.

8. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines uPAR-Antagonisten.
9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung.
10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Targetingvehikels für uPAR-exprimierende Zellen.
11. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Angiogenese-Inhibitors.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 20393P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 06905	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/07/1999
Anmelder WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/72 A61K38/49 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 46632 A (KESSLER HORST ;BUERGLE MARKUS (DE); GRAEFF HEINRICH (DE); MAGDOLEN) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) in der Anmeldung erwähnt	1,4-13
Y	Siehe spez. Seite 4, Zeile 11 bis Seite 8, Zeile 11; Anspr. 1-10,13-16	1-13
Y	--- WO 98 21230 A (HANEY DAVID N ;VARGA JANOS (US); JONES TERENCE R (US); ANGSTROM PH) 22. Mai 1998 (1998-05-22) Anspruch 1	1-13
A	--- WO 97 12905 A (SHISEIDO CO LTD ;GEN HOSPITAL CORP (US)) 10. April 1997 (1997-04-10) in der Anmeldung erwähnt Das ganze Dokument; siehe spez. Tabelle 2 --- -/--	1-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Groenendijk, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MAGDOLEN V ET AL: "SYSTEMATIC MUTATIONAL ANALYSIS OF THE RECEPTOR-BINDING REGION OF THE HUMAN UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, DE, BERLIN, Bd. 237, 1996, Seiten 743-751, XP000652373</p> <p>ISSN: 0014-2956</p> <p>Siehe spez. Seite 749, Spalte 1</p> <p>-----</p>	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06905

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846632 A	22-10-1998	AU 7216498 A	11-11-1998
		AU 7525398 A	11-11-1998
		WO 9846731 A	22-10-1998
		EP 0971948 A	19-01-2000
		EP 0975743 A	02-02-2000
WO 9821230 A	22-05-1998	US 5942492 A	24-08-1999
		AU 4991297 A	03-06-1998
		EP 0941235 A	15-09-1999
WO 9712905 A	10-04-1997	US 6120765 A	19-09-2000
		AU 6418794 A	24-10-1994
		CA 2159637 A	13-10-1994
		EP 0692968 A	24-01-1996
		EP 0857174 A	12-08-1998
		JP 8510207 T	29-10-1996
		WO 9422464 A	13-10-1994

MAR 2002
PATENT COOPERATION TREATY

Weickmann & Weickmann
PCT/EP00/06905
E 7. FEB. 2002
Frist:
Patentanwälte

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 29 January 2002 (29.01.02)	
Applicant's or agent's file reference 20393P WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP00/06905	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)
Applicant WILEX AG et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

AU,CA,CN,JP,KP,KR,NZ,US


The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,EP,AE,AG,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  ALI SOLEIMAN </div>
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

8

Applicant's or agent's file reference 20393P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06905	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 19 July 1999 (19.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C0K7/00		
Applicant WILEX AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 February 2001 (14.02.01)	Date of completion of this report 19 October 2001 (19.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06905

1. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-21, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-11, filed with the letter of 26 July 2001 (26.07.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/12-12/12, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06905

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 9

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 9 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See annex

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient).

Continuation of: BOX III

There are no uniform criteria against which the industrial applicability of **Claim 9** can be assessed for all the PCT Contracting States. Patentability may also depend on the wording of the claims. For example, the European Patent Office does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound. It may, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the preparation of a drug for a new medical application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8, 10, 11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1: WO-A-98/46632 (cited in the application (page 4, line 1))

- Document **D1**, which is considered to be the prior art closest to the subject matter of Claim 1, discloses (the references in parentheses are to D1) peptide compounds which act as inhibitors to prevent the bonding of urokinase to the urokinase receptor (see the abstract). More particularly, **D1** discloses the synthetic peptide cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ (page 18, line 11, and Figure 3 on page 3/5 of the drawings).
- The subject matter of Claim 1 of the present application **differs** from this known compound in that the amino carboxylic acid group X²¹ is Asp, Glu, Dap, Dab, D-Pen, Alg, Orn, Lys or D-Cys.
- The subject matter of **Claims 1-11** is therefore **novel** (PCT Article 33(2)).
- The **problem addressed** by the invention can thus be seen as that of providing alternative compounds which are more efficient than cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ as urokinase receptor antagonists.

5. The solution proposed in **Claim 1** involves an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

5.1 D1 proposes a compound with the structural formula (I) as per the present application (Claim 1), wherein:

- X²¹ is D-Cys (page 4, line 31; page 7, lines 1-2 and 7, and/or
- X²² is Asn (page 5, line 2), and/or
- X²³ is Lys (page 5, line 8), and/or
- X²⁴ is Tyr (page 5, line 12), and/or
- X²⁵ is Phe (page 5, line 13), and/or
- X²⁶ is Ser (page 5, line 17), and/or
- X²⁷ is Asn (page 5, line 2), and/or
- X²⁸ is Ile (page 5, line 23), and/or
- X²⁹ is Cys (page 4, line 31), and/or
- X³⁰ is Trp (page 5, line 27), and
- Y is a spacer (page 4, line 19, and Claim 1), wherein
- m and n are 0 or 1 (page 4, line 20, and Claim 1), wherein
- the monomer building blocks are joined by -NR¹CO- or -CONR¹- bonds (page 4, lines 21-24, and Claim 1), wherein
- at least two of the amino acid residues in the peptides according to the invention have the same side chain as an amino acid in the same position in the native uPA sequence (page 5, lines 30-35, and Claims 4 and 5), and wherein
- X²¹ to X³⁰ are replaced by an amino acid residue (Claims 2 and 3; see also page 4, line 29 - page 5, line 35) (none of the monomer building blocks X²¹ to X³⁰ are as described in the present application).

5.2 Since the compounds described in the present application are not suggested by D1, and since they are more efficient than cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ as urokinase receptor antagonists (see Figure 2 of the present application; the IC₅₀ values from 78 to 550 nM are considerably better than the IC₅₀ values of the synthetic peptide

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA₂₁₋₃₀ (page 4, lines 5-12, and page 16, line 25 - page 17, line 3; the IC₅₀ value is 2260 nM)), the subject matter of Claim 1 involves an inventive step.

5.3 Claims 2-11 are dependent on Claim 1 and therefore also meet the PCT requirement in respect of inventive step.

6. Industrial applicability (PCT Article 33(4))

Claims 1-8, 10 and 11 meet the requirement of PCT Article 33(4) in respect of industrial applicability.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/06905

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description is not consistent with the claims (PCT Rule 5.1(a)(iii)). For example, in line 10 on page 5 of the description, X²¹ is Pen, yet in Claim 1 X²¹ cannot be Pen. The same applies to the drawings (Nle28, Arg23, Pen29, Gln22, Phe24 and Phe30 in Figure 2 are inconsistent with the claims).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/06905

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The phrase "one of the amino acid residues X^{21} to X^{30} " in Claims 1, 2 and 3 is vague and equivocal, and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature referred to. Consequently the definition of the subject matter of the claim is not clear (PCT Article 6).

20393 PWO

Wilex

Wilex

27. JULI 2001

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/05811 A3(51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 38/49, A61P 35/00

C12N 9/72,

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/06905

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. Juli 2000 (19.07.2000)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

199 33 701.2

19. Juli 1999 (19.07.1999)

DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzerstrasse 10B, D-81675 München (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILHELM, Olaf [DE/DE]; Säbenerstrasse 188, D-81545 München (DE). KESSLER, Horst [DE/DE]; Lörenskogstrasse 4, D-85748 Garching (DE). BÜRGLE, Markus [DE/DE]; Rudolf-Camrer-Strasse 1, D-81369 München (DE). POTTHOFF, Nils [DE/DE]; Etzenhausenerstrasse 1b, D-85221 Dachau (DE). SCHMEDEBERG, Niko [DE/DE]; Pienzenauerstrasse 1a, D-81679 München (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:

19. Juli 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/05811 A3

(54) Title: CYCLIC PEPTIDOMIMETIC UROKINASE RECEPTOR ANTAGONISTS

(54) Bezeichnung: ZYKLISCHE PEPTIDOMIMETISCHE UROKINASEREZEPTORANTAGONISTEN

(57) Abstract: The invention relates to cyclic peptides which are used as inhibitors to prevent urokinase from bonding to a urokinase receptor. The cyclic peptides are suitable for use as pharmaceutical active ingredients to combat diseases which are mediated by urokinase and the receptor thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor. Diese zyklischen Peptide sind als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 45563 0
(0700) WEICKMAN
TELEFAX (089) 45563 999
E-MAIL email@weickmann.de
TELEX 522 621

Unser Zeichen:
20393P WO/WWei

Anmelder:
Wilex Biotechnology GmbH
Grillparzerstraße 10B

81675 München
DE

Zyklische peptidomimetische Urokinaserezeptorantagonisten

Zyklische peptidomimetische Urokinaserezeptorantagonisten

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als Inhibitoren der Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor, die als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet sind, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden. Die erfindungsgemäßen Substanzen sind von der uPA-Sequenz abgeleitete Peptide und entfalten als Liganden des Urokinaserezeptors (uPAR) eine antagonistische Wirkung, und werden im folgenden als uPAR-Antagonisten bezeichnet.

15

Die Serinprotease uPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator) ist für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse verantwortlich, wie etwa den proteolytischen Abbau von extrazellulärem Matrixmaterial, das für die Invasibilität und Wanderung von Zellen sowie für die Geweberemodellierung notwendig ist. uPA bindet mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-10}$ - 10^{-9} M) an den membranständigen uPA Rezeptor (uPAR) auf der Zelloberfläche.

20

Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor ist an vielen invasiven biologischen Prozessen wie etwa der Metastasierung bösartiger Tumoren, der Trophoplastenimplantation, Entzündungen und Angiogenese beteiligt. Daher sind Antagonisten von uPAR in der Lage, die Invasivität, Metastasierung und Angiogenese von Tumoren zu hemmen. uPAR-Antagonisten können als Mittel zur Therapie invasiver und metastasierender Krebserkrankungen eingesetzt werden, bei denen uPA und uPAR an den invasiven Foci von Tumoren auftreten (Dano et al.: The receptor for urokinase plasminogen activator: Stromal cell involvement in extracellular proteolysis during cancer invasion, in: Proteolysis and Protein Turnover, Barrett, A. J. und Bond, J., HRSG, Portland Press, London, 1994, 239), z. B. bei Krebserkrankungen

30

von Brust, Lunge, Darm und Ovarien. Darüber hinaus können uPAR-Antagonisten auch für andere Zwecke eingesetzt werden, bei denen eine Hemmung der proteolytischen Aktivierung von Plasminogen erforderlich ist, beispielsweise zur Bekämpfung von Krankheiten wie Arthritis, Entzündungen, Osteoporose, Retinopathien und zur Kontrazeption.

Der uPA Rezeptor ist in WO 90/ 12091 sowie in den Veröffentlichungen Ploug et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 17539 und Ronne et al., J. Immunol. Methods 167 (1994), 91 beschrieben.

uPA wird als einzelkettiges Molekül (pro-uPA) synthetisiert und enzymatisch in einen aktiven zweikettigen uPA überführt. Das uPA Molekül besteht aus drei strukturell unabhängigen Domänen, der N-terminal lokalisierten wachstumsfaktorartigen Domäne (GFD, uPA 1 - 46), einer Kringelstrukturdomäne (uPA 45 - 135) und der Serinproteasedomäne (uPA 159 - 411). GFD und die Kringeldomäne bilden zusammen das sogenannte aminoterminal Fragment von uPA (ATF, uPA 1 - 135), das durch weitere proteolytische Spaltung von zweikettigem uPA erzeugt wird. ATF bindet an den uPA Rezeptor mit einer ähnlichen Affinität wie uPA.

Die rezeptorbindende Region von uPA erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 12 bis 32, da ein Peptid, welches die Aminosäurereste 12 bis 32 von uPA enthält (wobei Cystein an Position 19 durch Alanin ersetzt ist) mit ATF um die Bindung an den uPA Rezeptor kompetiert (Appella et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 4437-4440). Weiterhin wurde dort gezeigt, daß dieses Peptid auch nach Zyklisierung durch Verbrückung der beiden Cysteinreste an den Positionen 12 und 32 eine Affinität für den uPA Rezeptor zeigt. In einem alternativen Ansatz wurden von Goodson et al., (Proc. Natl. Acad. USA 91 (1994), 7129-7133) antagonistische uPA-Peptide für den uPAR mittels Musterung einer Bakteriophagen-Peptidbibliothek identifiziert. Diese Peptide zeigten keine ersichtliche Sequenzhomologie zu der natürlichen uPAR-bindenden Sequenz von uPA.

In neueren Veröffentlichungen (Rettenberger et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (1995), 587-594); Magdolen et al., Eur. J. Biochem. 237 (1996), 743-751; Goretzki et al., Fibrinolysis and Proteolysis 11 (1997), 11-19) sind weitere Untersuchungen an der uPAR-Bindungsregion des uPA beschrieben. Dabei wurden die Reste Cys19, Lys23, Tyr24, Phe25, Ile28, Trp30 und Cys31 als wichtige Determinanten für eine uPA/uPAR-Wechselwirkung identifiziert. Als wirksamster Inhibitor wurde in diesen Untersuchungen ein uPA-Peptid mit den Aminosäuren 16 bis 32 von uPA identifiziert.

Magdolen et al. (1996) supra, analysieren die uPAR-Bindungsregion des uPA-Moleküls unter der Verwendung eines Peptids mit den Aminosäuren 14 bis 32 von uPA und davon abgeleiteten Peptiden. Diese sowie auch die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Peptide (vgl. z.B. Appella et al. (1987) supra) weisen jedoch eine relativ geringe Affinität zum uPAR auf.

WO-A-94/22646 offenbart lineare Peptide mit einer Länge von 6 bis 18 Aminosäuren, die aus dem Bereich der Aminosäuren 14 bis 33 von uPA stammen. Es wird beschrieben, daß kurze von uPA abgeleitete Peptide (uPA 21-29 und uPA 21-26) in der Lage sind, das Wachstum von Keratinozyten zu beeinflussen. Zwar wird in WO-A-94/22646 auf einen möglichen Einsatz der beanspruchten Peptide für die Blockierung der uPA/uPAR-Wechselwirkung hingewiesen, es werden jedoch keinerlei Daten oder Hinweise auf derartige Bindungsstudien gezeigt. Darüber hinaus enthalten die als bevorzugt genannten linearen Peptide uPA 21-29 und uPA 21-26 nicht die minimale uPAR-Bindungsregion von linearen uPA-Peptiden, welche den Sequenzbereich der Aminosäuren 19 bis 31 umfaßt. Die Beeinflussung des Wachstums von Keratinozyten durch diese kurzen Peptide beruht somit sehr wahrscheinlich nicht auf einer uPA/uPAR-Wechselwirkung.

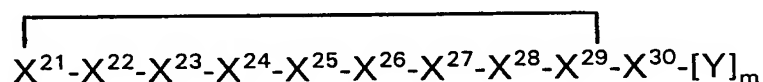
WO 98/46632 offenbart uPAR-Peptidinhibitoren, die vom linearen Peptid uPA (19-31) und zyklischen Derivaten davon abgeleitet sind und an ausgewählten Positionen D-Aminosäurereste tragen.

5 Ein Beispiel für einen solchen Peptidinhibitor ist das Peptid cyclo[21,29][D-Cys²¹,Cys²⁹]uPA₂₁₋₃₀. Dieses Peptid besitzt eine bereits recht hohe Affinität für uPAR (IC₅₀ = 78nM), die nur noch um einen Faktor 4 geringer als die Affinität des aminoterminalen Fragments von uPA (ATF = Aminosäuren 1-135 der Urokinase) mit einem IC₅₀-Wert von 21 nM ist. Das entsprechende
10 ausschließlich aus L-Aminosäuren zusammengesetzte Peptid cyclo[(21,29)-[Cys²¹,Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ hat eine hundertfach geringe Aktivität im Vergleich zu ATF.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin,
15 durch Einbau isostruktureller oder/und isofunktioneller natürlicher bzw. nichtnatürlicher Aminosäuren die Struktur des uPAR-Peptidinhibitors zu modifizieren und somit eine weitere Verbesserung hinsichtlich der Affinität für uPAR, der Serumstabilität oder/und der therapeutischen Wirkung zu erreichen.

20

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



25

worin

X²¹-X³⁰

monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung X²¹ = D-Cys, X²² = Asn, X²³ = Lys, X²⁴ = Tyr, X²⁵ = Phe, X²⁶ = Ser, X²⁷ = Asn, X²⁸ = Ile, X²⁹ = Cys und X³⁰ = Trp abgeleitet sind,

30

Y

ein Spacer ist und m 0 oder 1 ist, und

die monomeren Bausteine über -CONR¹- oder -NR¹CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R¹ jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,

5 mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebene Aminosäurereste ersetzt ist:

- X²¹: Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure
10 (Dab), Penicillamin (Pen), D-Pen, Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;
X²²: Gln, Asp, Glu;
X²³: Orn, Dap, Arg, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);
X²⁴: Phe, Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-
carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-
15 Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal), Cha
(Cyclohexylalanin);
X²⁵: Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;
X²⁶: Thr, Val, Homoserin (Hse);
X²⁷: Gln, Asp, Glu;
20 X²⁸: Val, Leu, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle), Norvalin
(Nva), Nle, α -Aminoisobuttersäure (Aib), Cha;
X²⁹: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;
X³⁰: Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, Octahydroindolyl-2-carbonsäure (Oic),
His, Thiazolylalanin (Thia), Phg, Tryptamin, Tryptophanamid (Trp-
25 NH₂).

Bevorzugt sind Peptide, bei denen mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur einer der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- 30 X²¹: D-Pen;
X²²: Gln;
X²³: Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;

X²⁴: Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁷: Asp;
X²⁸: Nle, Val, Cha;
5 X²⁹: Pen;
X³⁰: Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia, Trp-NH₂.

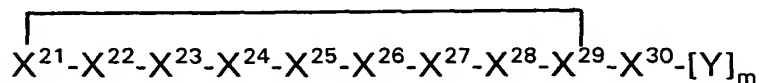
Besonders bevorzugt sind Peptide, in denen mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur einer der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

10 X²¹: D-Pen;
X²³: Arg, Nle, Cit, Hci;
X²⁴: Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
15 X²⁸: Nle, Cha;
X²⁹: Pen;
X³⁰: Trp-NH₂.

Y ist eine Spacergruppe, z. B. eine aus einer oder mehreren Aminosäuren aufgebaute peptidische Spacergruppe, z.B. Poly-Lys, oder eine andere Spacergruppe, z.B. eine Polyethylenglykolgruppe. Das Peptid kann über die Gruppe Y an Trägersubstanzen gekoppelt werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Peptide mit einem neungliedrigen Ring, wobei mindestens 2, vorzugsweise mindestens 3 und besonders bevorzugt mindestens 4 der den Ring bildenden Aminosäurereste eine Sequenz aus der uPA-Region 22 bis 28 aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin

X^{21} - X^{30} monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung X^{21} = D-Cys, X^{22} = Asn, X^{23} = Lys, X^{24} = Tyr, X^{25} = Phe, X^{26} = Ser, X^{27} = Asn, X^{28} = Ile, X^{29} = Cys und X^{30} = Trp abgeleitet sind, 5
Y ein Spacer ist und m 0 oder 1 ist, und

die monomeren Bausteine über -CONR¹- oder -NR¹CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R¹ jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, 10
und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,

mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste X^{21} - X^{30} der Leitstruktur durch einen nicht-proteinogenen Aminosäurerest ersetzt ist, wobei die resultierenden Verbindungen vorzugsweise eine erhöhte 15
Proteasestabilität, insbesondere eine erhöhte Stabilität gegenüber physiologischen Proteasen, z.B. im Blut oder Gewebe vorkommenden Proteasen, wie etwa Plasmin oder/und im Verdauungstrakt vorkommenden Proteasen wie etwa Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin im Vergleich zur Leitstruktur aufweisen. Vorzugsweise ist zumindest der Aminosäurerest 20
 Lys^{23} durch eine nicht-proteinogene Aminosäure, d.h. durch eine nicht genetisch kodierte Aminosäure wie etwa Orn, Dap, Dab, Cit, Hci oder Nle ersetzt.

Neben Peptiden der Strukturformel (I) sind auch pharmazeutisch verträgliche 25
Salze und Derivate davon als uPAR-Antagonisten geeignet. Als Derivate kommen dabei insbesondere solche Verbindungen in Betracht, die an reaktiven Gruppen der Seitenkette oder/und des N- bzw. C-Terminus, z. B. an Amino- oder Carbonsäuregruppen, modifiziert sind. Beispiele für solche Modifikationen sind eine Acylierung, z. B. eine Acetylierung von 30
Aminogruppen oder/und eine Amidierung oder Veresterung von Carbonsäuregruppen, z.B. eine Amidierung der C-terminalen Aminosäure.

Die monomeren Bausteine sind über Säureamidbindungen NR^1CO oder CONR^1 verknüpft, d. h. die Peptidsequenzrichtung kann umgekehrt werden (Retropeptide). R^1 kann wie in nativen Polypeptiden Wasserstoff bedeuten. Andererseits kann R^1 jedoch auch einen Alkylrest, z. B. Methyl oder Ethyl, und insbesondere Methyl bedeuten, da durch eine N-Alkylierung der Amidbindung oftmals eine starke Aktivitätsbeeinflussung bewirkt werden kann (vgl. z. B. Levian-Teitelbaum et al., Biopolymers 28 (1989), 51-64). Als monomere Bausteine werden die α -Aminocarbonsäuren - sofern nicht anders angegeben - in Form von L-Enantiomeren eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Verbindungen, wobei die monomeren Bausteine X^{21} und X^{29} miteinander verbrückt sind. Diese Verbrückung kann beispielsweise über die Seitenketten der jeweiligen α -Aminocarbonsäurereste erfolgen, wobei eine Verbrückung über Disulfidbindungen, z. B. zwischen zwei Cysteinresten besonders bevorzugt ist. Andere Arten der Zyklisierung zwischen Aminosäureseitenketten sind jedoch auch möglich, z. B. Amidbindungen zwischen einer Aminosäure mit einer Aminoseitengruppe, z. B. Ornithin oder Lys und einer Aminosäure mit einer Carbonsäureseitengruppe wie etwa Asp oder Glu. Weiterhin kann die Disulfidbrücke auch durch eine Alkylen-Brücke ersetzt werden, um die chemische Stabilität zu erhöhen. Darüber hinaus sind auch Verknüpfungen von einer Aminosäureseitenkette mit dem Peptidrückgrat, z. B. Verknüpfung einer Aminoseitengruppe, z.B. einer ω -Aminoseitengruppe, mit dem C-terminalen Ende bzw. Verknüpfung einer Carbonsäureseitengruppe mit dem N-terminalen Ende möglich. Auch eine Verknüpfung von N- und C-Terminus ist möglich. Die erfindungsgemäßen Peptide sind durch chemische Synthese wie in den Beispielen erläutert erhältlich.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens ein Peptid oder Polypeptid wie zuvor definiert gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Trägers, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält. Insbesondere werden die

erfindungsgemäßen Peptide oder Polypeptide zur Herstellung von uPAR-Antagonisten verwendet, die sich auch zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung eignen. Weiterhin können erfindungsgemäße Peptide -
5 ebenso wie die Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys²¹,Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ als Inhibitoren der Angiogenese eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen uPAR-Peptidantagonisten zur Herstellung von
10 Targetingvehikeln, z.B. Liposomen, viralen Vektoren etc., für uPAR-exprimierende Zellen. Das Targeting kann für diagnostische Anwendungen zum gesteuerten Transport von Markierungsgruppen, z.B. radioaktiven oder nichtradioaktiven Markierungsgruppen erfolgen. Andererseits kann das Targeting für therapeutische Anwendungen, z.B. zum Transport von
15 pharmazeutischen Wirkstoffen, beispielsweise auch zum Transport von Nukleinsäuren für die Gentherapie erfolgen.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können in beliebiger Form vorliegen, beispielsweise als Tabletten, als beschichtete
20 Tabletten oder in Form von Lösungen oder Suspensionen in wässrigen oder nichtwässrigen Lösungsmitteln. Die Peptide werden vorzugsweise oral oder parenteral in einer flüssigen oder festen Form verabreicht. Bei Verabreichung in flüssiger Form wird Wasser vorzugsweise als Trägermedium verwendet, das gegebenenfalls Stabilisatoren, Löslichkeitsvermittler oder/und Puffer
25 enthält, die üblicherweise für Injektionslösungen verwendet werden. Solche Zusatzstoffe sind beispielsweise Tartrat- oder Boratpuffer, Ethanol, Dimethylsulfoxid, Komplexierungsmittel wie etwa EDTA, Polymere wie etwa flüssiges Polyethylenoxid, etc.

30 Bei Verabreichung in fester Form können feste Trägersubstanzen wie etwa Stärke, Lactose, Mannitol, Methylcellulose, Talkum, hochdisperses Siliciumoxid, hochmolekulare Fettsäuren wie etwa Stearinsäure, Gelatine,

Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette oder feste hochmolekulare Polymere wie etwa Polyethylenglykole eingesetzt werden. Weiterhin können die Formulierungen zu oralen Applikation sofern gewünscht auch Aroma- und Süßstoffe enthalten.

5

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Zusammensetzungen können auch in Form von Komplexen vorliegen, z.B. mit Cyclodextrinen wie etwa γ -Cyclodextrin. Die verabreichte Dosis hängt vom Alter, Gesundheitszustand und Gewicht des Patienten, von der Art und der Schwere der Erkrankung, von der Art der Behandlung, von der Häufigkeit der Verabreichung und der Art der gewünschten Wirkung ab. Die tägliche Dosis der aktiven Verbindung ist üblicherweise 0,1 bis 50 mg/Kilogramm Körpergewicht. Normalerweise sind 0,5 bis 40 und vorzugsweise 1,0 bis 20 mg/kg/Tag in einer oder mehreren Dosen ausreichend, um die gewünschten Wirkungen zu erreichen.

15

Weiterhin soll die Erfindung durch die im Nachfolgenden beschriebenen Beispiele und Figuren erläutert werden.

20 Es zeigen:

Figur 1 den Vergleich der Affinität der Peptide cyclo[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ und cyclo[21-29][D-Cys²¹,Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (a) bzw. cyclo[21,29][Cys^{21,29}]uPA₂₁₋₃₀ und dem entsprechenden Peptid-Amid(b)

25

Figur 2 IC₅₀-Werte von Modifikationen der Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys²¹,Cys²⁹]uPA₂₁₋₃₀;

Figur 3 eine schematische Darstellung für bevorzugte Modifikationen der Leitstruktur;

30

Figur 4 die Stabilität der Peptide cyclo[19,31]-uPA₁₆₋₃₂,
cyclo[21,29][D-Cys²¹,Tic²⁵,Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und
cyclo[21,29][D-Cys²¹,Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ in Humanserum (a) und
heparinisiertem Humanblut (b);

5

Figur 5 die Plasmin-Resistenz von uPA-Peptiden nach Substitution von
Lys²³ durch nicht-proteinogene Aminosäuren.

Beispiele

10

1. Methoden

1.1 Festphasenpeptidsynthese

15 Lineare Peptide wurden auf einem 2-Chlortritylharz (Barlos et al., Int. J.
Pept. Protein Res. 37 (1991), 513 bis 520) oder einem Tritylchlorid-
Polystyrolharz unter Verwendung eines Applied Biosystems Modell 431 A
Peptidsynthesizers bzw. eines multiplen Peptidsynthesizers Modell Syro II
(MultiSynTech) synthetisiert. Unter Anwendung der orthogonalen Fmoc-
20 Strategie (Carpino und Han, J. Org. Chem. 37 (1972), 3404-3409; Fields
und Noble, Int. J. Peptide Protein Res. 35 (1990), 161-214) wurden die
Aminosäureseitenketten mit den Schutzgruppen Trityl (Asn, Cys, Gln und
His), tert.-Butyloxycarbonyl (Lys und Trp), tert.-Butyl (Asp, Glu, Ser, Thr
und Tyr), Acetamidomethyl (Cys) und 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sul-
25 fonyl oder 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Arg)
blockiert. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur in Dimethylformamid
unter Verwendung eines dreifachen Überschusses von 2-(1H-Benzotriazol-1-
yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat/1-Hydroxybenzotriazol/Fmoc-
Aminosäure mit 2,5 Äquivalenten von N-Ethyl-diisopropylamin in N-Methyl-
30 pyrrolidon. Die Fmoc-Gruppe wurde durch sequenzielle Behandlung der
Harze mit einem Überschuß von 40 % bzw. 20 % Piperidin in Dimethyl-
formamid entfernt. Die Abspaltung der Peptide und die Entfernung der

Seitenkettenschutzgruppen wurde gleichzeitig durch Behandlung mit 93 % Trifluoressigsäure/5 % Triisopropylsilan/3 % H₂O (0 °C/1 h; Raumtemperatur/1h) durchgeführt. Im Fall von mit 2,2,5,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-geschützten Arg-Gruppen wurden die Peptide für zusätzliche 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die rohen Peptide wurden mit Diethylether bei -30 °C präzipitiert, in Methanol gelöst, wie zuvor präzipitiert, in tert.-Butanol gelöst und lyophilisiert. Tryptophan enthaltende Peptide wurden zusätzlich mit 5 % Essigsäure für 2 h vor der Lyophilisierung behandelt.

Die Peptide wurden durch HPLC unter Verwendung einer Reverse Phase C-18 Säule (Nucleosil 1005-C18) oder einer YMC-Pack ODS Säule gereinigt. Die Zyklisierung erfolgte durch eine Disulfidbrückenbildung. Die hierzu erforderliche Oxidation wurde durch Aufnehmen von 0,1 bis 0,3 mg/ml der gereinigten linearen Peptide in 80 % Wasser und 20 % DMSO (Vol/Vol) und Entfernen des Lösungsmittels unter verringertem Druck nach 10 h durchgeführt. Die zyklischen Peptide wurden erneut durch HPLC wie zuvor beschrieben gereinigt.

1.2 Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse

Die gereinigten und entsalzten Peptide wurden auf dem HPLC-System 140 B (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die UV-Absorption wurde mit einem UVIS 200 Detektor (Linear Instruments, Reno, USA) bei 206 nm gemessen. Die Chromatographie erfolgte auf einer Aquapore 3 μ (Applied Biosystems, Foster City, USA) Reverse Phase Säule (1 mm x 50 mm) mit einer Durchflußrate von 20 μ l/min. Das Lösungsmittelsystem war 0,1 % TFA in Wasser (A) und 0,1 % TFA in Acetonitril (B). Das HPLC System war an eine Atmosphärendruck-Ionisationsquelle gekoppelt, die an ein Tandem-Quadrupolinstrument API III (Sciex, Perkin Elmer, Thornhill, Kanada) angeschlossen war.

Die Quadrupol M/Z-Skala wurde mit den Ammoniumadduktionen von Polypropylenglykol kalibriert. Die durchschnittlichen Massenwerte wurden von den M/Z-Peaks in den Ladungsverteilungsprofilen der mehrfach geladenen Ionen berechnet (Covey et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2 (1988), 249-256; Fenn et al., Science 246 (1989), 64-71).

Die Aminosäureanalyse wurde nach der Ninhydrinmethode unter Verwendung des Analysesystems 6300 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) nach Hydrolyse der Peptide durch die TFA-HCl-Dampfphasenmethode (Tsugita et al., J. Biochem. 102 (1987), 1593-1597) durchgeführt, die eine quantitative Bestimmung der Peptidkonzentration erlaubt.

1.3 Durchflußzytometrie

Die Kapazität der synthetischen Peptide zu Hemmung der uPA/uPAR-Wechselwirkung wurde mittels Durchflußzytometrie an dem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der humanen Promyeloidzelllinie U937 als Quelle für zellulären nativen uPAR bestimmt (Chuchulowski et al., Fibrinolysis 6, Suppl. 4 (1992), 95-102; Magdolen et al., (1996), supra). Die U937 Zellen wurden mit 1 mM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 h stimuliert. Nach Stimulierung mit PMA exprimieren die U937 Zellen beträchtliche Mengen an zelloberflächenassoziiertem uPAR.

Die stimulierten Zellen wurden mit 50 mM Glycin-HCl, 0,1 NaCl, pH 3,6 für 1 min bei Raumtemperatur behandelt, um endogenen rezeptorgebundenen uPA zu dissoziieren. Anschließend wurde der saure Puffer durch 0,5 M HEPES-100 mM NaCl, pH 7,5 neutralisiert. Die Zellen wurden dann sofort zweimal mit PBS/0,1 % Rinderserumalbumin (RSA) gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS/0,1 % RSA resuspendiert, auf eine Konzentration von 10^6 Zellen pro ml eingestellt und simultan mit 16 ng FITC-konjugiertem pro-uPA und

unterschiedlichen Mengen der synthetischen Peptide für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Analyse wurde Propidiumiodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet, zu jeder Probe gegeben, um die Lebensfähigkeit der analysierten U937 Zellen zu bestimmen. Die beschädigten, Propidiumiodid-markierten Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

1.4 Festphasen uPAR/uPA-Bindetest

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Analysen wurde ein Festphasen ATF-Ligandenbindetest zur Untersuchung der Wechselwirkungen von synthetischen Peptiden mit uPAR durchgeführt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit rekombinantem humanem uPAR aus CHO Zellen (Wilhelm et al., FEBS Lett. 337 (1994), 131-134; Magdolen et al., Elektrophoresis 16 (1995), 813-816) beschichtet und die restlichen proteinbindenden Stellen mit 2 % RSA (Gew/Vol) abgesättigt. Nach Inkubation mit den Proben (0,6 ng ATF zusammen mit 15 µg synthetisches Peptid pro ml) und mehrfachen Waschschritten wurde die Menge an ATF, die an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten uPAR gebunden hatte, unter Verwendung eines biotinylierten monoklonalen Mausantikörpers gegen die Kringeldomäne von ATF (Nr. 377, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) und anschließender Zugabe von Avidin-Peroxidase-Konjugat und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/H₂O₂ als Substrat für die Peroxidase bestimmt. Das Vorhandensein von synthetischen Peptiden, die mit der ATF-Bindung an uPAR kompetieren, verringert den Umsatz des chromogenen Substrats.

1.5 Bestimmung der Stabilität von Peptiden in Körperflüssigkeiten

Die Stabilität von uPA-abgeleiteten Peptiden in humanem Serum oder Vollblut wurde in vitro getestet.

Für die Präparation von Humanseren wurde venöses Blut ohne Anti-koagulans in Polypropylen-Röhrchen bei 37°C 45 min gerinnen gelassen. An der Gefäßwand anhaftende Gerinnsel wurden mit einem Plastikstäbchen abgelöst und bei 1200 x g 12 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das
5 überstehende Serum wurde abgenommen und entweder frisch für Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt oder aliquotiert bei -20°C zur späteren Verwendung eingefroren.

Für Stabilitätsuntersuchungen in humanem Vollblut wurde venöses Blut
10 durch Heparin-Natrium (1000 I.E. je 10 ml Vollblut) gerinnungsgehemmt und frisch verwendet. Die zu prüfenden Peptide wurden in Form von Peptidgemisch-Stammlösungen ($\geq 1 \mu\text{g}$ je Peptid in H_2O) den Körperflüssigkeiten in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Serum bzw. $200 \mu\text{l}$ Vollblut (je Peptid) zugefügt und für verschiedene Zeiten bei 37°C
15 inkubiert. Vor der Analyse durch HPLC wurden Vollblutinkubationen 5 min bei Raumtemperatur $16.000 \times g$ zentrifugiert und das überstehende Plasma abgenommen.

Seren und Plasmen wurden vor der HPLC-Analytik über HLB-Vorsäulen
20 (Waters GmbH, Oasis HLB extraction cartridge $1\text{cm}^3/30 \text{ mg}$) vorgereinigt. Dazu wurden $100 \mu\text{l}$ der Flüssigkeiten mit PBS auf 1 ml verdünnt und auf die mit 1 ml 100% Methanol und 1 ml H_2O konditionierte HLB-Vorsäulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 1 ml 5% Methanol in H_2O gewaschen und mit 1 ml 100% Methanol eluiert. Von dem Eluat wurden die ersten
25 $200 \mu\text{l}$ (4 Tropfen) als Totvolumen verworfen. Die folgenden $500 \mu\text{l}$ Eluat wurden mit $500 \mu\text{l}$ PBS verdünnt und HPLC-analysiert. Die restlichen $300 \mu\text{l}$ des Eluats wurden verworfen. Die HPLC-Analytik wurde durchgeführt mit einer YMC-5 C_{18} analytischen Säule und einem 20-60% Gradienten aus H_2O , 0,1% Trifluoressigsäure und Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure über
30 30 min und Detektion der Analyten bei 220 nm.

1.6 Bestimmung der Protease-Resistenz

Die Empfindlichkeit von Peptiden gegen den Angriff verschiedener Proteasen des Verdauungstrakts wurde mit gereinigten Enzymen unter geeigneten Pufferbedingungen in vitro durchgeführt. Generell wurden 10 µg Peptid in einem Volumen von 100 µl 30 min bei 37°C mit 2 µg Protease unter den vom Hersteller für die Aktivitätskontrollen angegebenen Pufferbedingungen inkubiert. Nach Inkubation wurden die Ansätze nach Verdünnung mit 300 µl H₂O ohne Vorreinigung über eine Vorsäule direkt durch HPLC mit einem 20-60% Gradienten aus H₂O, 0,1 % Trifluoressigsäure und Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure analysiert.

Pepsin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde mit Peptiden in 52 mM HCl inkubiert. Inkubationen mit Trypsin (Sigma) wurde in 63 mM Natriumphosphat pH 7,6 durchgeführt. Chymotrypsine α , β , γ , δ (ICN) wurden in 50 mM CaCl₂ und 40 mM Tris/Cl pH 7,8 inkubiert. Mit bakterieller Proteinase K wurde in ungepuffertem Wasser inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Peptid cyclo[19,31]-uPA₁₆₋₃₂, das mit Ausnahme der Cysteinverbrückung der Originalsequenz des uPA-Omega-Loops entspricht, eingesetzt. Die Empfindlichkeit von Peptiden gegen die Gewebeprotease Plasmin (Sigma) wurde in Ansätzen mit 10 oder 5 µg Peptiden und 0,05 U Plasmin in 100 µl 200 mM Natriumphosphat pH 7,5 bei 37°C und einer Inkubationsdauer von 30 min getestet.

2. Ergebnisse

2.1 Inhibitorische Wirkung des Peptids cyclo[21,29]

[D-Cys²¹,Cys²⁹]uPA₂₁₋₃₀

Figur 1a zeigt die inhibitorische Wirkung des Peptids cyclo[21,29] [D-Cys²¹,Cys²⁹]uPA₂₁₋₃₀ im Vergleich zu dem ausschließlich aus L-Aminosäuren bestehenden zyklischen Peptid cyclo[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀. Der IC₅₀ Wert des zyklischen Peptids mit D-Cys an Position 21 wurde mit 78 nM bestimmt, während der IC₅₀ Wert des nur aus L-Aminosäuren

zusammengesetzten zyklischen Peptids mit 2260 nM bestimmt wurde. Der IC_{50} Wert des aminoterminalen Fragments von uPA (Aminosäuren 1 bis 135 von uPA) liegt im Vergleich dazu bei 21 nM.

5 2.2 Synthese von modifizierten uPA Peptiden

Unter Verwendung von $cyclo[21,29][D-Cys^{21},Cys^{29}]uPA_{21-30}$ als Leitstruktur wurden weitere zyklische Peptide hergestellt, in denen bestimmte Aminosäuren durch andere, insbesondere nicht-proteinogene Aminosäuren
10 substituiert wurden. Die relativen Aktivitäten im Vergleich zur Leitstruktur sind in Figuren 1b und 2 gezeigt.

Figur 3 zeigt Beispiele für besonders bevorzugte Modifikationen der Leitstruktur.

15

2.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von Peptiden in humanem Serum und Vollblut

Es wurde die Stabilität der Peptide $cyclo[19,31]-uPA_{16-32}$ (A),
20 $cyclo[21,29][D-Cys^{21},Tic^{25},Cys^{29}]-uPA_{21-30}$ (B) und $cyclo[21,29][D-Cys^{21},Cys^{29}]-uPA_{21-30}$ (C) in Humanserum und heparinisiertem Humanblut getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Figur 4a und 4b gezeigt. Die Peaks bei 20,5 min entsprechen dem Peptid A, die Peaks bei 23,0 min entsprechen dem Peptid B und die Peaks bei 24,9 min entsprechen dem
25 Peptid C.

Zur Untersuchung der Stabilität der Peptide in humanem Serum (Fig. 4a) wurde ein Gemisch von jeweils 12,5 μg der Peptide zu rund 250 μl Serum gegeben. 100 μl davon wurden mit PBS auf 1 ml verdünnt, auf einer HLB-
30 Vorsäule vorgereinigt und sofort durch HPLC analysiert (mittleres Profil). Weitere 100 μl wurden nach 20,5 h Inkubation bei 37°C (unteres Profil) analysiert. Als Kontrolle wurden jeweils 5 μg der Peptide mit 1 ml PBS

versetzt und analysiert (oberes Profil). Der Peak bei 21,2 min entspricht einem nicht identifizierten Metaboliten.

Zur Untersuchung der Stabilität in heparinisiertem Humanblut (Figur 4b) wurden 37,5 µg der Peptide mit 750 µl frisch präpariertem heparinisiertem Humanblut versetzt. 375 µl wurden sofort danach abzentrifugiert. 100 µl des Plasmaüberstands wurden analysiert (mittleres Profil). Die restlichen 375 µl wurden für 20,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend analysiert (unteres Profil). Als Kontrolle wurden bereits 5 µg der Peptide mit 1 ml PBS versetzt und analysiert (oberes Profil).

Nach 20,5 h Inkubation in humanem Serum bei 37°C konnte das Peptid A (cyclo[19,31]-uPA₁₆₋₃₂) nicht mehr nachgewiesen werden. Statt dessen erschien ein neuer Peak mit relativ verlängerter Retentionszeit (Abb. 4a unterstes HPLC-Profil, RT 21,233 min), der vermutlich einem Metaboliten von A entspricht. Die relativen Retentionszeiten und Peak-Integrale der Peptide B (cyclo[21,29][D-Cys²¹Tic²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀) und C (cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀) blieben dagegen nach Exposition gegen Humanserum annähernd gleich. Daraus kann auf eine unveränderte chemische Identität und Konzentration der beiden Peptide nach 20,5-stündiger Exposition gegen Humanserum geschlossen werden.

Auch die Exposition der Peptide gegen frisch isoliertes heparinisiertes Vollblut über 20,5 h zeigte die Instabilität von A. In diesem Fall konnte weder die unveränderte Substanz noch ein vermuteter Metabolit detektiert werden. Demgegenüber erschienen die Peaks der Peptide B und C im Humanblut stabil. Der Peak von A erscheint im Vergleich mit der PBS-Kontrolle bereits in der unmittelbar nach Zugabe zum Vollblut aufgearbeiteten und analysierten Probe wesentlich reduziert. Offenbar genügte die kurze Zeitspanne zwischen Zugabe der Peptide und Vorreinigung auf Vorsäulen (10-15 min) aus, einen wesentlichen Teil der zugefügten Peptidmenge (>80%) abzubauen.

Die Peak-Integrale der beiden D-Cys-Derivate B und C aus Plasma sind deutlich größer als in der PBS-Kontrolle, obwohl sie bezogen auf die Gesamtvolumina von PBS und Vollblut in gleicher Konzentration eingesetzt wurden. Nach Inkubation wurden die Peptide aber nur im Plasma nach Entfernung der Blutkörperchen analysiert. Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß die D-Cys-Derivate sich vorwiegend im Plasma verteilen, aber nicht signifikant in Blutzellen eindringen können bzw. binden können.

2.4 Stabilität von uPA-Peptiden gegen Plasmin

Geprüft auf die Empfindlichkeit gegen Angriff durch die Gewebeprotease Plasmin wurden die Peptidleitstruktur cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und deren Modifikationen an der Position 23 cyclo[21,29][D-Cys²¹-Orn²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (Ornithin), cyclo[21,29][D-Cys²¹Dab²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (2,4-Diaminobuttersäure), cyclo[21,29][D-Cys²¹Dap²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (2,3-Diaminopropionsäure), cyclo[21,29][D-Cys²¹Nle²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (Norleucin) und cyclo[21,29][D-Cys²¹Arg²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (Arginin). Die Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ enthält die aus Urokinase bekannte Plasminspaltstelle, nämlich die Peptidbindung zwischen Lys²³ und Tyr²⁴.

Figur 5 zeigt HPLC-Profile von Peptidvarianten vor (obere Profile) und nach (untere Profile) Inkubation mit Plasmin. Teilabbildung (A) zeigt die unveränderte Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ mit Lysin an Position 23, (B) die Ornithin-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys²¹Orn²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, (C) die Diaminobuttersäure-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys²¹Dab²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, (D) die Diaminopropionsäure-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys²¹Dap²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀, (E) die Norleucin-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys²¹Nle²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und (F) die Arginin-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys²¹Arg²³Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀. Die Protease Plasmin erscheint in den unteren Profilen jeweils bei ca. 17,5 min.

Nach Inkubation von cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ mit Plasmin und HPLC-Analyse der Produkte trat neben dem Peak der unveränderten Leitstruktur ein neuer, unbekannter Peak auf. Die Summe beider Peak-Integrale entsprach 93,5 % des Peak-Integrals der unveränderten Leitstruktur. Bei dem neuen Peak handelte es sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Plasmin-Spaltprodukt von cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀. Von den an Position 23 modifizierten Peptiden, die alle in Bezug auf die Konkurrenz mit uPA um die Bindung an den uPAR aktiv waren, erwiesen sich die Diaminbuttersäure-, Ornithin- und Norleucinsubstituierten als stabil gegen Plasmin (Figur 5). Bei der Arg²³-substituierten Variante trat nach Inkubation mit Plasmin ein neuer Peak auf, dessen Retentionszeit mit derjenigen des Plasminmetaboliten der unveränderten Leitstruktur annähernd identisch war, d.h. die Arg²³-substituierte Variante ist Plasmin-sensibel. Bei der Plasmin-Exposition der Diaminpropionsäuresubstituierten Variante traten zwei kleine unidentifizierte Peaks bei ca. 21 min auf. Deren Retentionszeit unterscheidet sich stark von den Retentionszeiten der Plasmin-Metaboliten der Leitstruktur und derjenigen der Arg²³-Variante. Entsprechend fraglich ist, ob die kleinen 21 min-Peaks tatsächlich spezifische Plasminspaltprodukte der Dap²³-Variante darstellen.

Durch Substitution von Lysin an Position 23 der cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ Leitstruktur durch nicht-proteinogene Aminosäuren kann Stabilität gegen die Gewebeprotease Plasmin erzeugt werden, ohne die biologische Aktivität wesentlich zu verändern.

2.5 Antiangiogenetische Wirksamkeit

Thorax-Aorten wurden aus 1 bis 2 Monate alten Wistar-Ratten gewonnen und sofort in eine Kulturschale mit serumfreiem Medium (RPMI) überführt. Das Gewebe um die Aorta wurde sorgfältig entfernt. Es wurden 1 mm lange Aortenringe präpariert und gründlich mit serumfreiem Medium gewaschen.

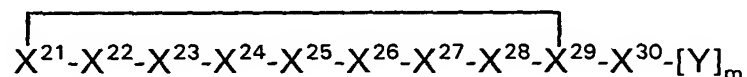
Vor dem Einbetten der Aortenringe in Matrigel wurde der Boden jeder Vertiefung mit 80 μ l Gellösung beschichtet. Nach Gelbildung wurden die Aortenringe in die Vertiefung überführt, positioniert und durch Überschichten mit 70 μ l Gellösung befestigt. Nach Gelbildung wurden
5 verschiedene Mengen des jeweiligen Testpeptids in die Vertiefungen gegeben. Als Kontrollen wurden Medium alleine, Medium mit Wachstumszusätzen und Medium mit Wachstumszusätzen und Kontrollpeptid untersucht. Die Kulturen wurden bei 35°C für 5 Tage gehalten und anschließend untersucht.

10 Die Testpeptide waren cyclo[21,29][D-Cys²¹,Cys²⁹]uPA₂₁₋₃₀ und cyclo[21,29][D-Cys²¹,Nle²³,Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ in Dosierungen von 0,001, 0,1, 1, 10, 25 und 50 μ g/ml. Die Testpeptide zeigten deutliche anti-angiogenetische Wirkungen im in vitro Gewebekulturtest. Eine Hemmung
15 der Kapillarbildung wurde im Konzentrationsbereich von etwa 1 μ g/ml und höher gefunden. Das Sprossen von Kapillaren, d.h. die Anzahl und Länge neu gebildeter Kapillaren konnte im Vergleich mit unwirksamen Kontrollpeptiden bei einer Peptidkonzentration von 30 μ g/ml um etwa den
20 Faktor 3 bis 4 verringert werden.

Ansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):

5



10

worin $X^{21}-X^{30}$ monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung $X^{21} = \text{D-Cys}$, $X^{22} = \text{Asn}$, $X^{23} = \text{Lys}$, $X^{24} = \text{Tyr}$, $X^{25} = \text{Phe}$, $X^{26} = \text{Ser}$, $X^{27} = \text{Asn}$, $X^{28} = \text{Ile}$, $X^{29} = \text{Cys}$ und $X^{30} = \text{Trp}$ abgeleitet sind, Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -CONR¹- oder -NR¹CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R¹ jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, ist mit der Maßgabe daß mindestens einer der Aminosäurereste $X^{21}-X^{30}$ der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebenen Aminosäurereste ersetzt ist:

15

20

X^{21} : Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure (Dab), Penicillamin (Pen), D-Pen, Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;

X^{22} : Gln, Asp, Glu;

25

X^{23} : Orn, Dap, Arg, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);

X^{24} : Phe, Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal) Cha (Cyclohexylalanin);

30

X^{25} : Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

X^{26} : Thr, Val, Homoserin (Hse);

X^{27} : Gln, Asp, Glu;

- X²⁸: Val, Leu, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle),
Norvalin (Nva), Nle, α -Aminoisobuttersäure (Aib);
X²⁹: Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;
X³⁰: Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, Octahydroindolyl-2-carbonsäure
(Oic), His, Thiazolylalanin (Thia), Phg, Tryptamin (Trp-NH₂).

2. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,

daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

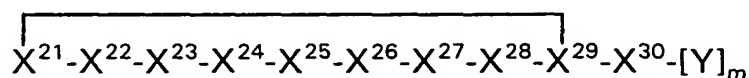
- X²¹: D-Pen;
X²²: Gln;
X²³: Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;
X²⁴: Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁷: Asp;
X²⁸: Nle, Val, Cha;
X²⁹: Pen;
X³⁰: Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia, Trp-NH₂.

3. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,

daß mindestens einer der Aminosäurereste X²¹-X³⁰ der Leitstruktur
eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

- X²¹: D-Pen;
X²³: Arg, Nle, Cit, Hci;
X²⁴: Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;
X²⁵: Thi;
X²⁸: Nle, Cha;
X²⁹: Pen;
X³⁰: Trp-NH₂.

4. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



5 worin X^{21} - X^{30} monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbon-
säurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung
 X^{21} =D-Cys, X^{22} =Asn, X^{23} =Lys, X^{24} =Tyr, X^{25} =Phe, X^{26} =Ser,
 X^{27} =Asn, X^{28} =Ile, X^{29} =Cys und X^{30} =Trp abgeleitet sind, Y ein
Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -
10 CONR¹- oder -NR¹CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R¹ jeweils
unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und
pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,
ist mit der Maßgabe daß mindestens einer der Aminosäurereste X^{21} -
 X^{30} der Leitstruktur durch einen nicht-proteinogenen Aminosäurerest
15 ersetzt ist.

5. Verbindungen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine erhöhte Proteasestabilität im Vergleich zur Leitstruktur
20 aufweisen.

6. Verbindungen nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß Lys²³ durch eine nicht-proteinogene Aminosäure ersetzt ist.
25

7. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{22} , X^{23} , X^{24} , X^{25} , X^{26} , X^{27} ,
 X^{28} und X^{30} eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher
30 Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

8. Verbindungen nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{24} , X^{25} , X^{28} und X^{30} die
gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.
- 5
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens
eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gegebenenfalls
zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder
Verdünnungsmitteln enthält.
- 10
10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1-8 zur
Herstellung eines uPAR-Antagonisten.
11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Bekämpfung von mit der
Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur
Tumorbekämpfung.
- 15
12. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur
Herstellung eines Targetingvehikels für uPAR-exprimierende Zellen.
- 20
13. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur
Herstellung eines Angiogenese-Inhibitors.

Zusammenfassung

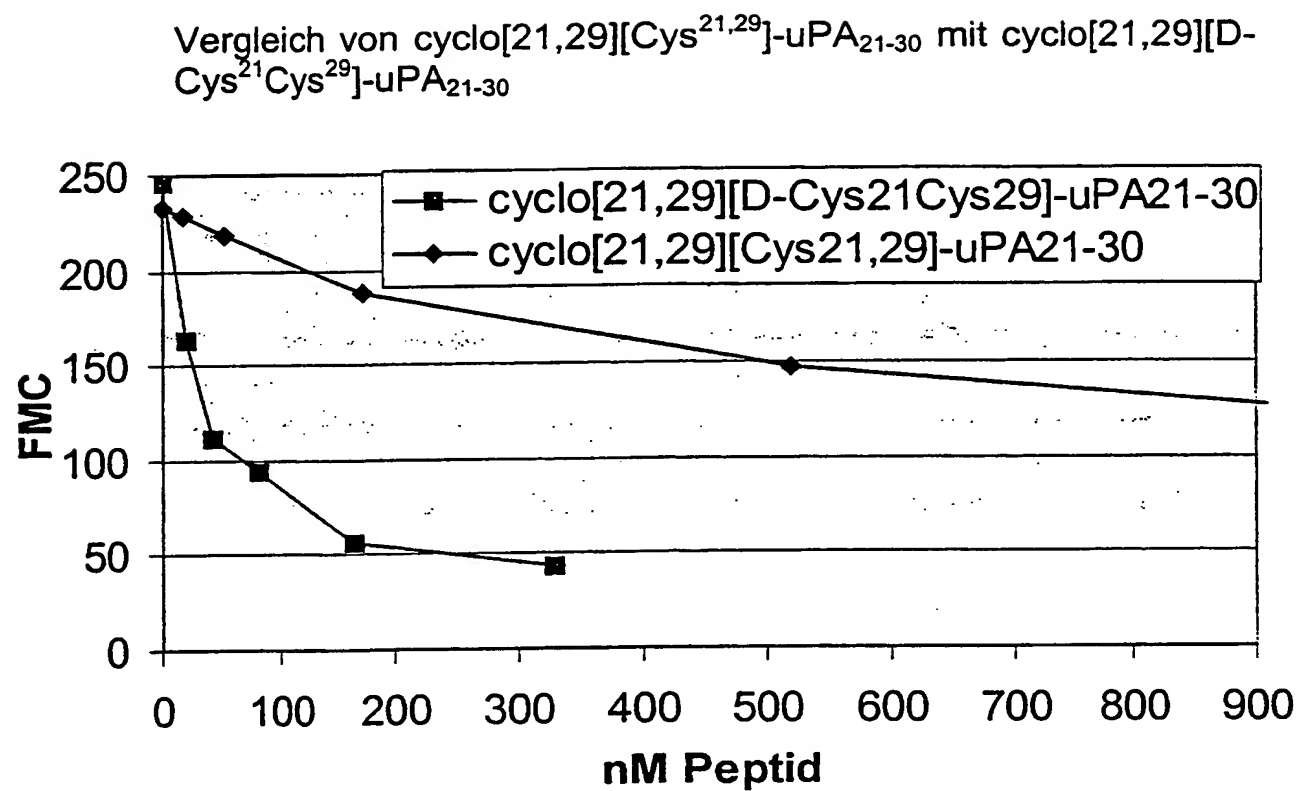
Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als Inhibitoren für die
5 Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor. Diese zyklischen Peptide
sind als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch
Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.

10

ei 18.07.2000 ANM/20393PWO

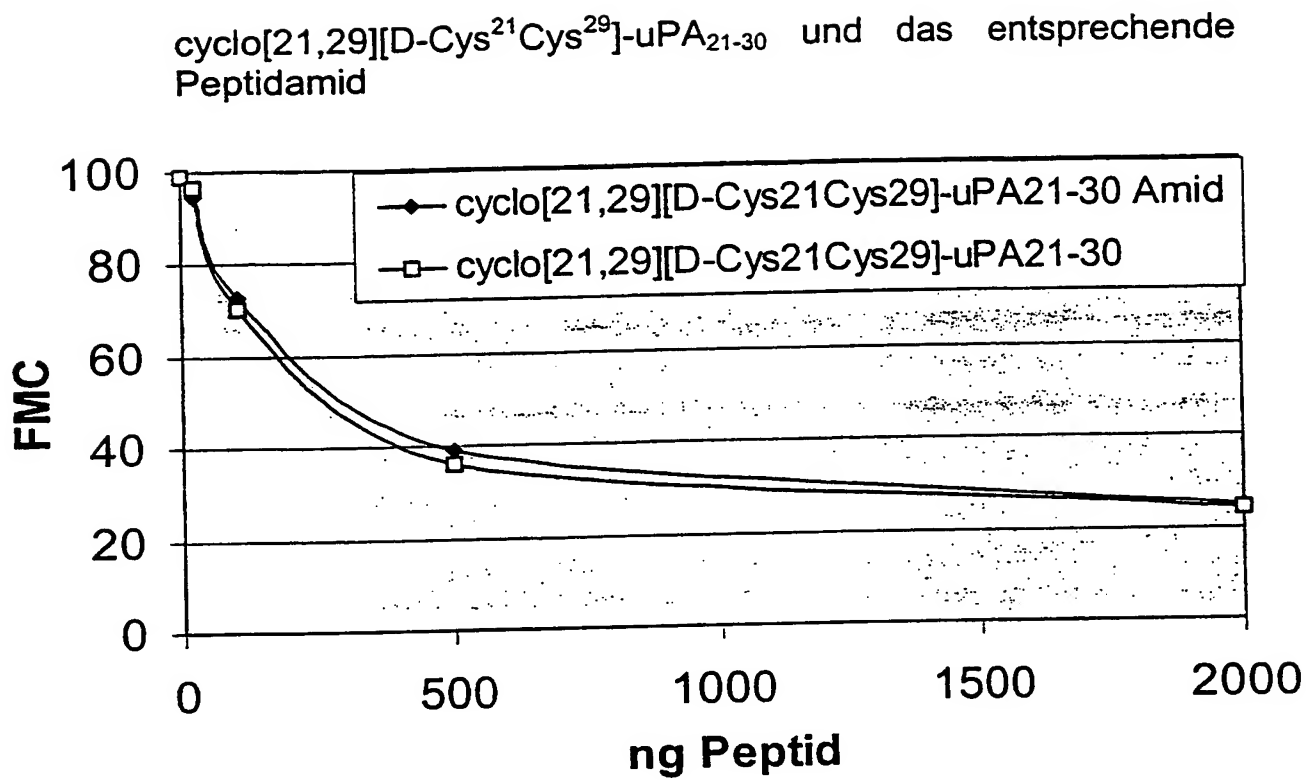
- 1/12 -

Fig. 1a



- 2/12 -

Fig. 1b



- 3/12 -

Fig. 2

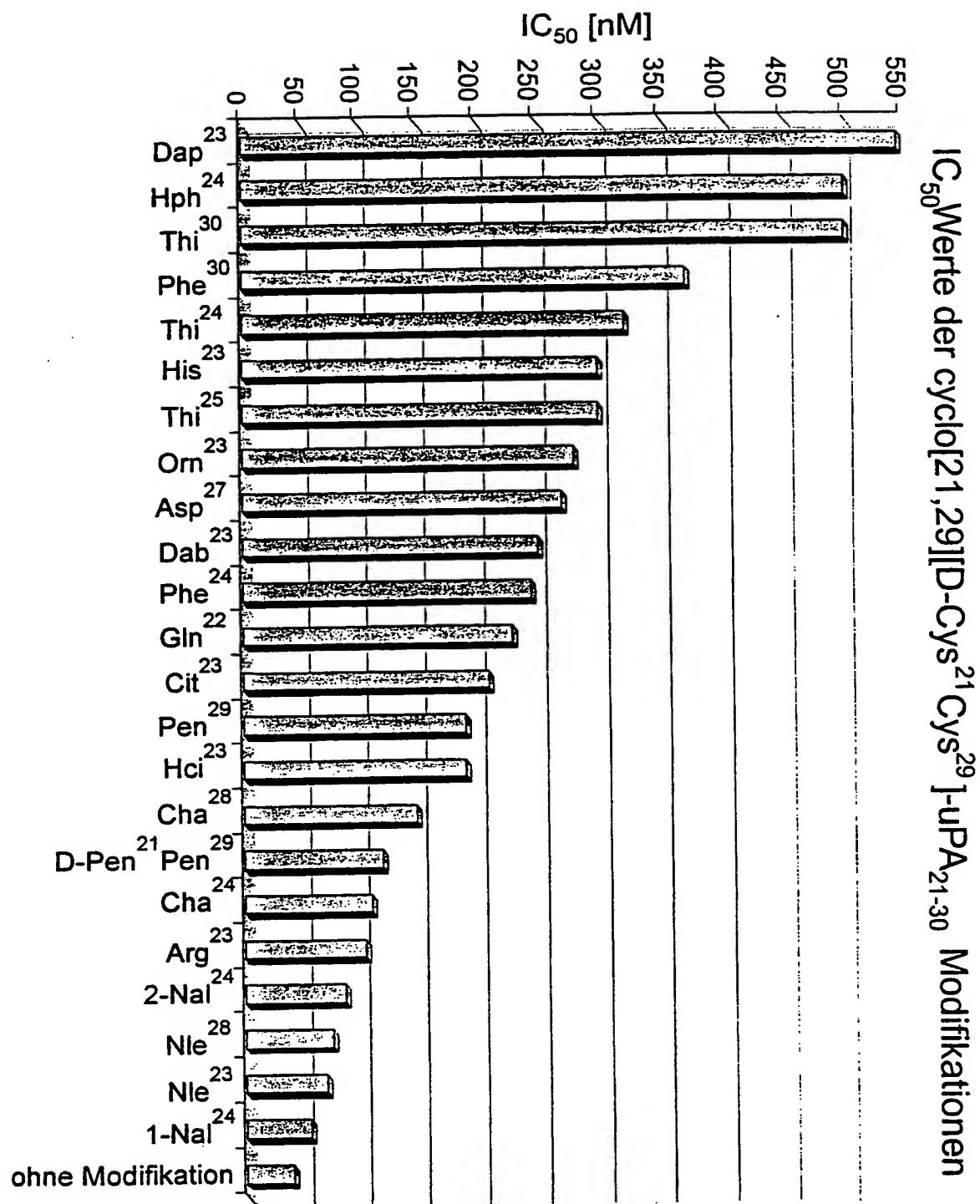
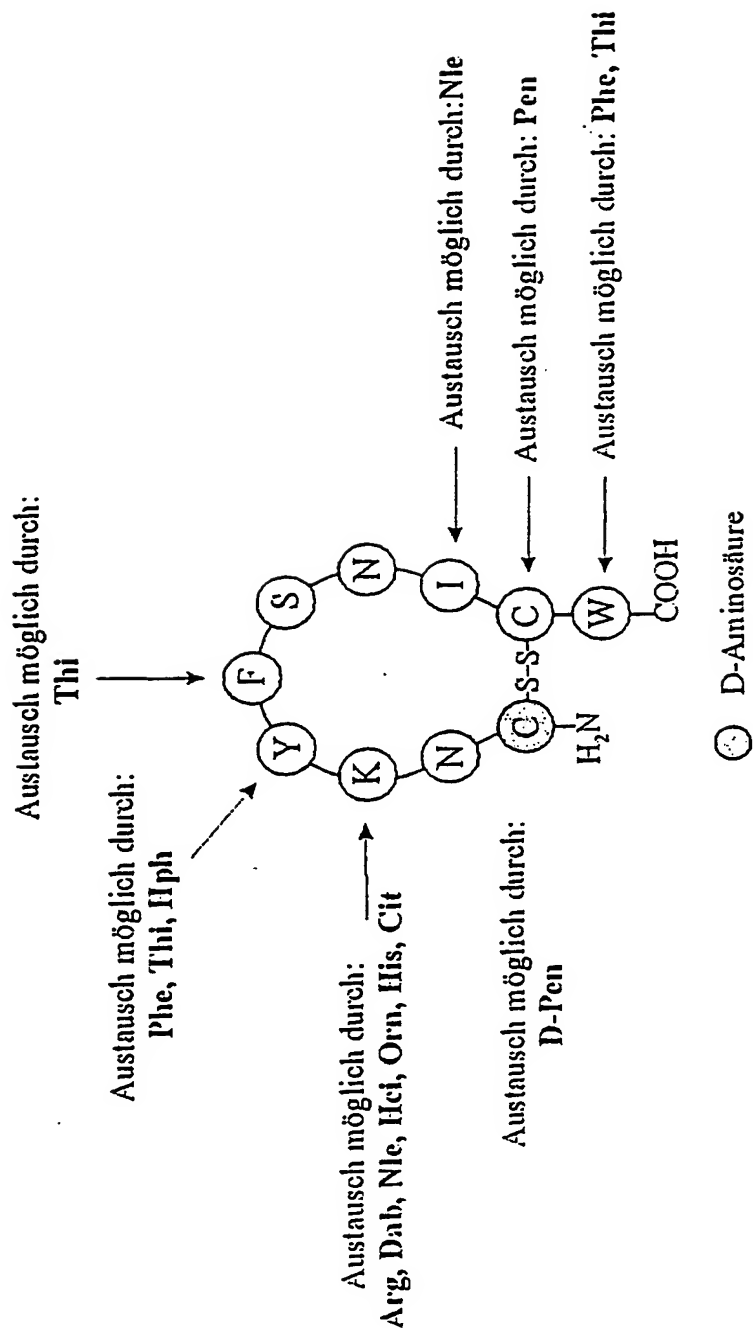
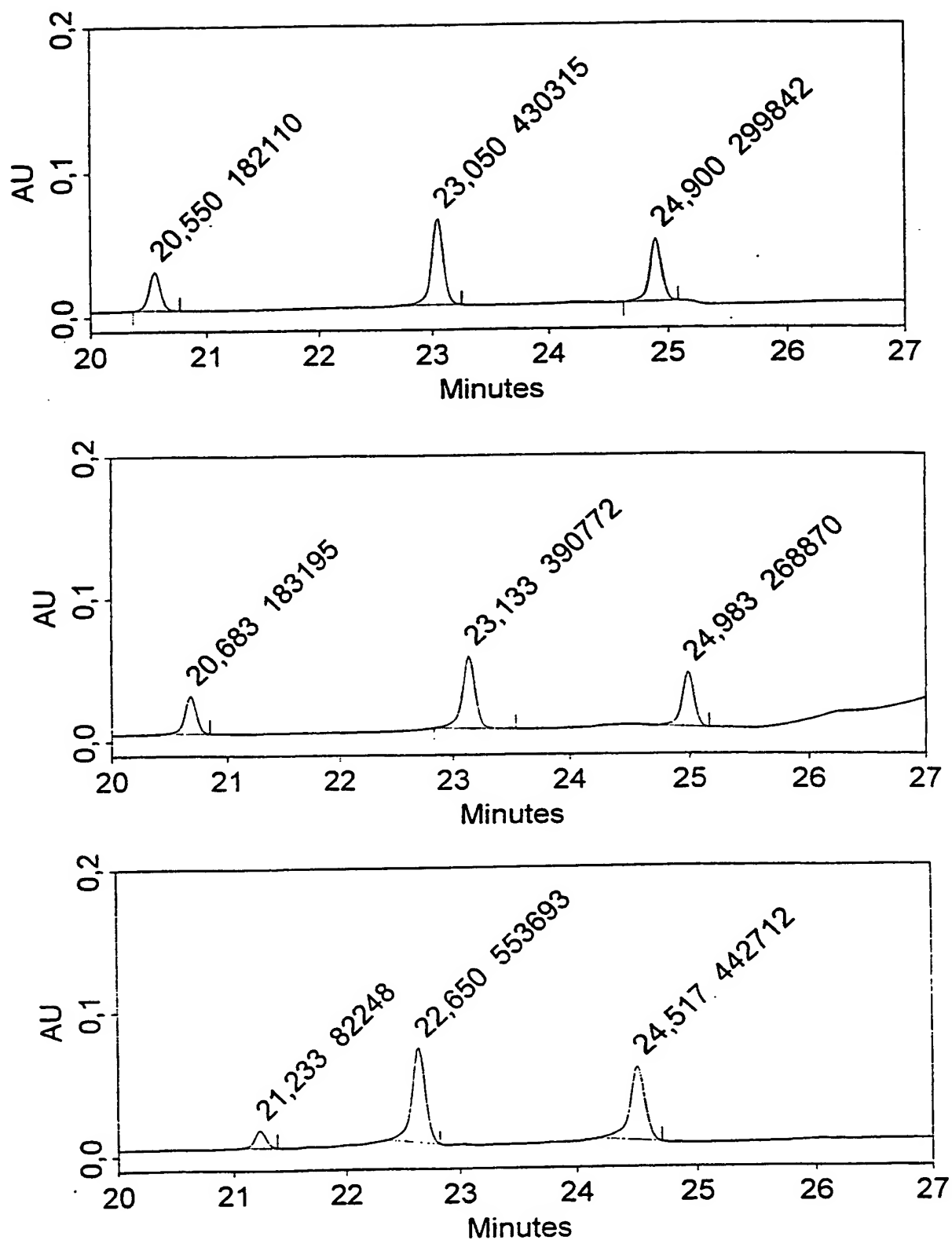


Fig. 3



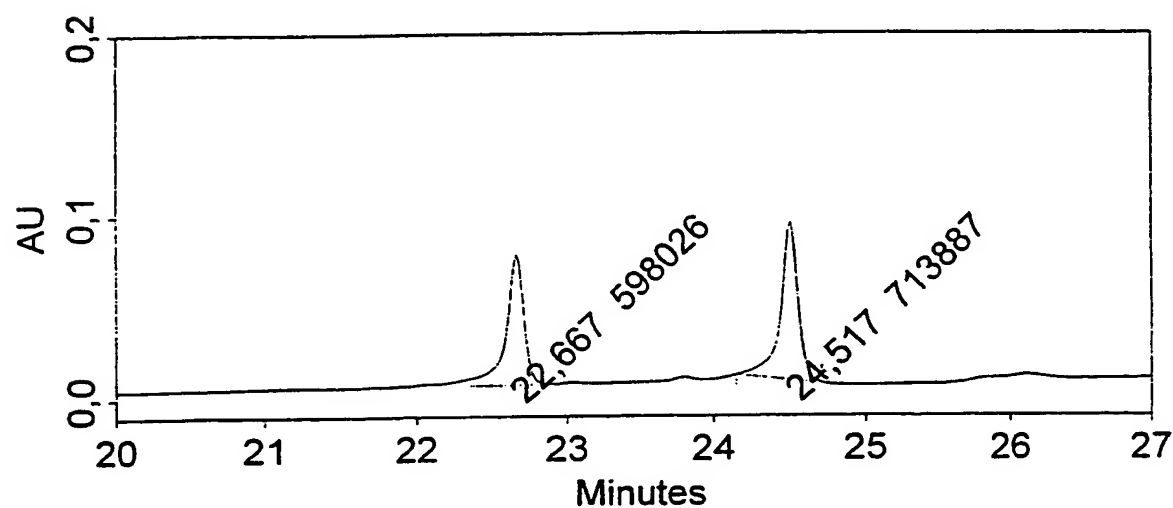
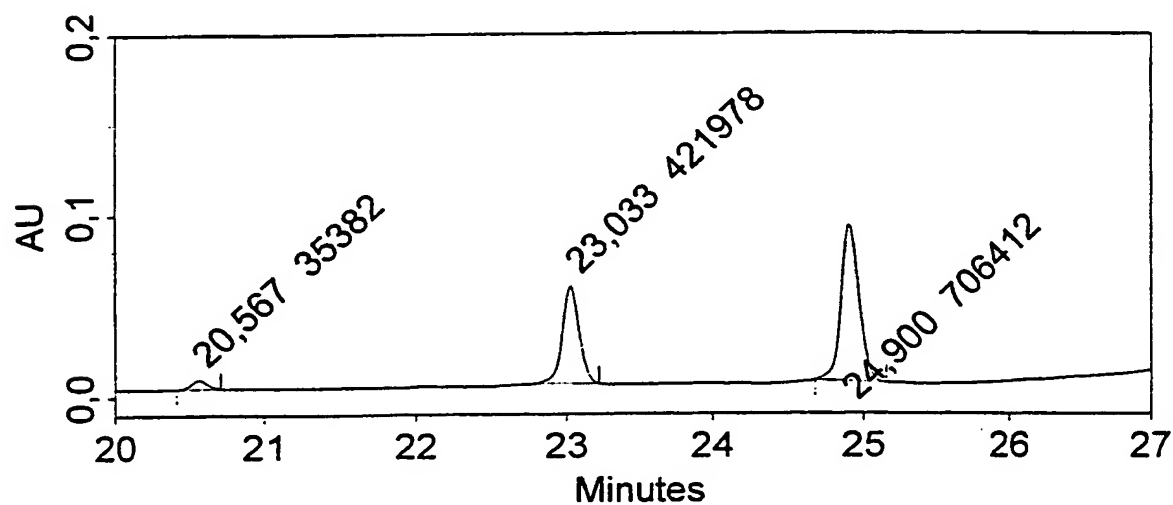
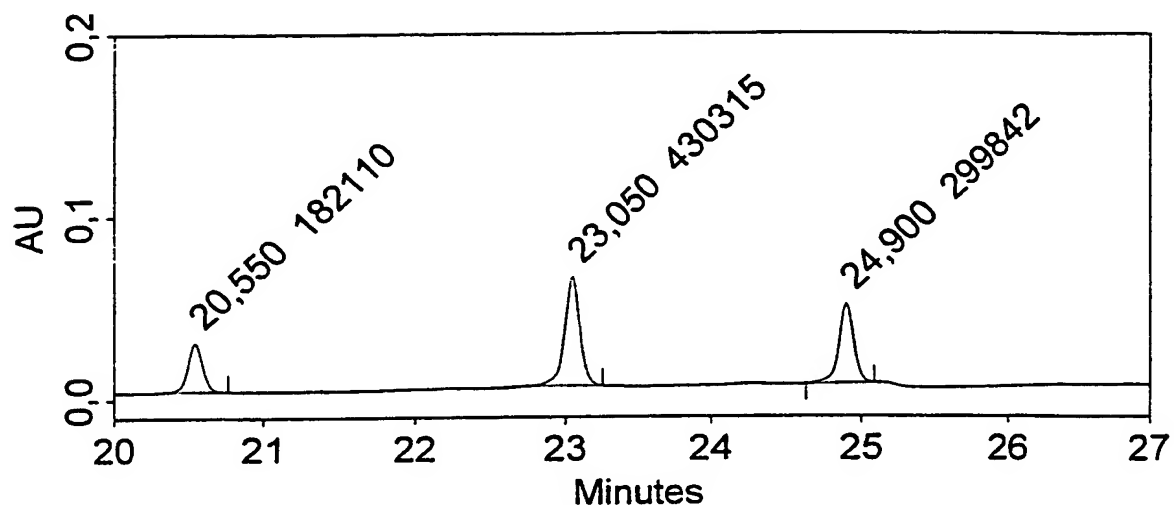
- 5/12 -

Fig. 4a



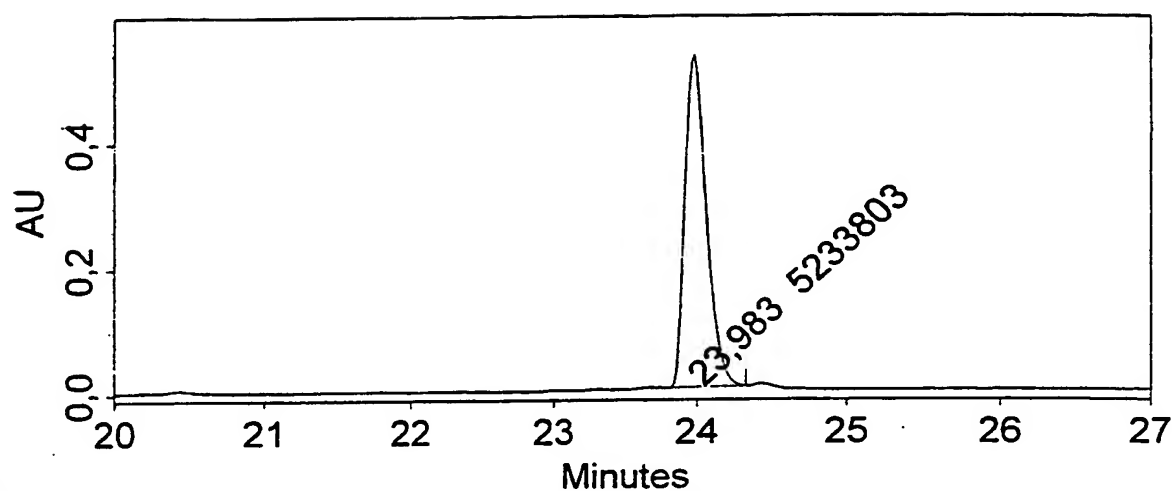
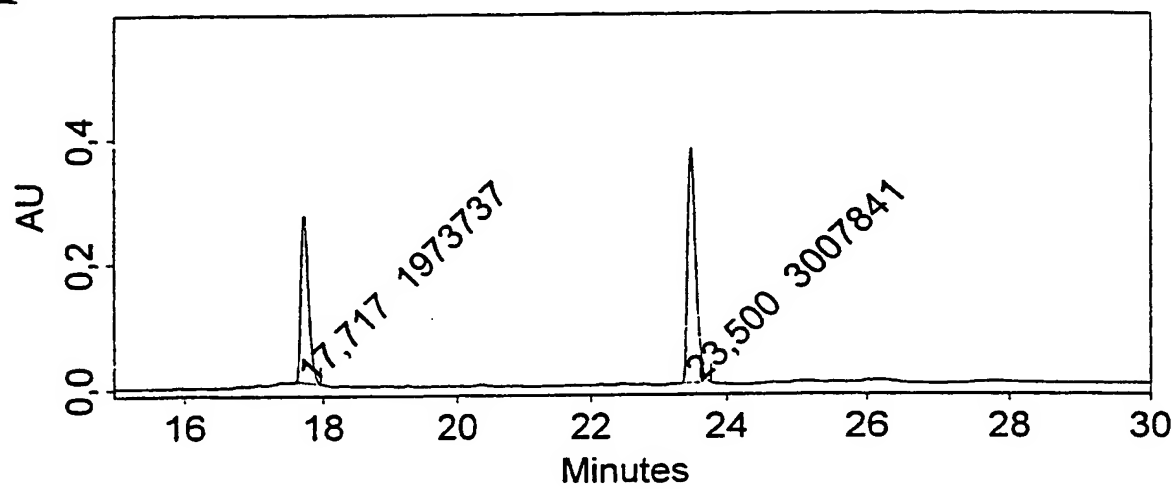
- 6/12 -

Fig. 4b



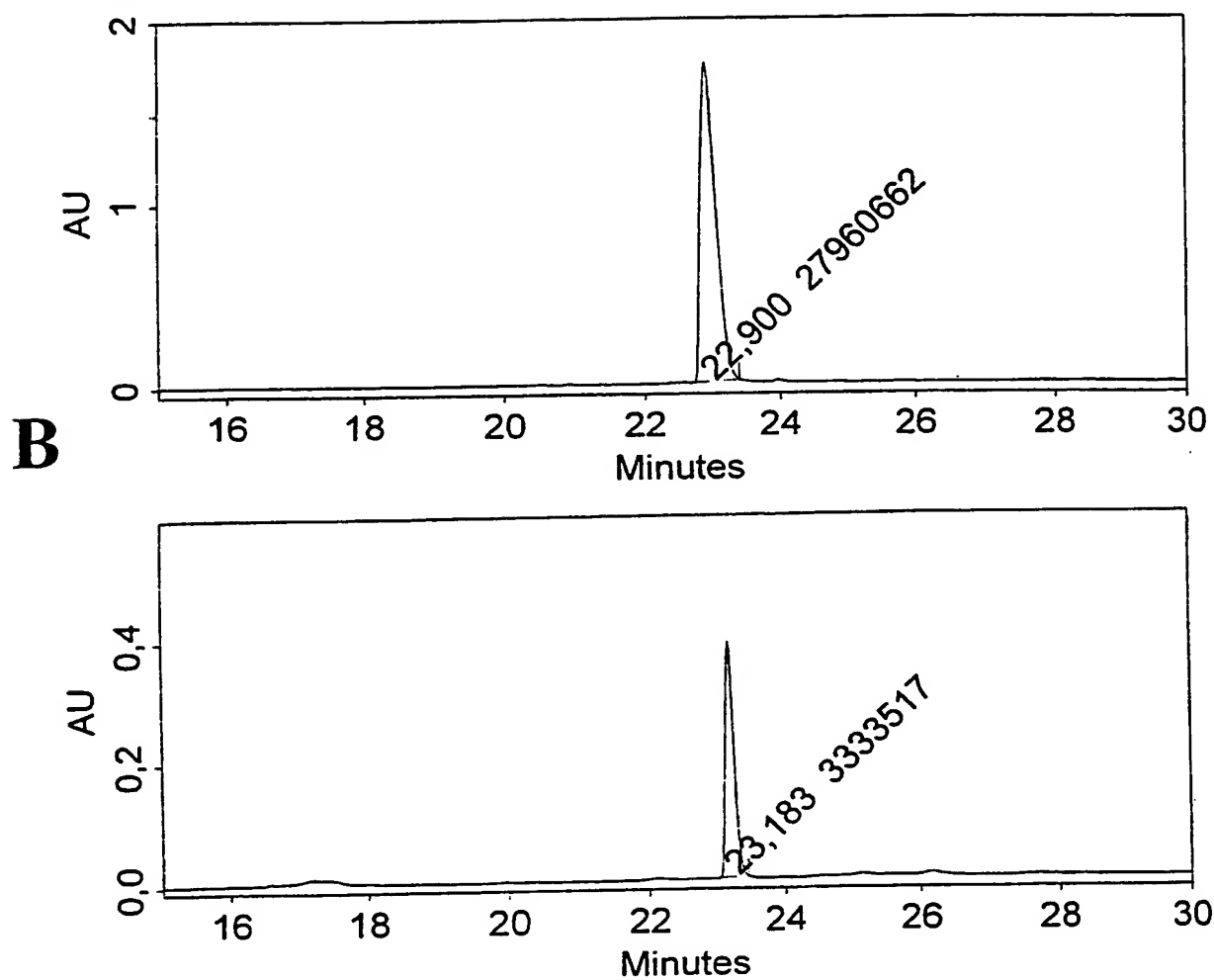
- 7/12 -

Fig. 5

**A**

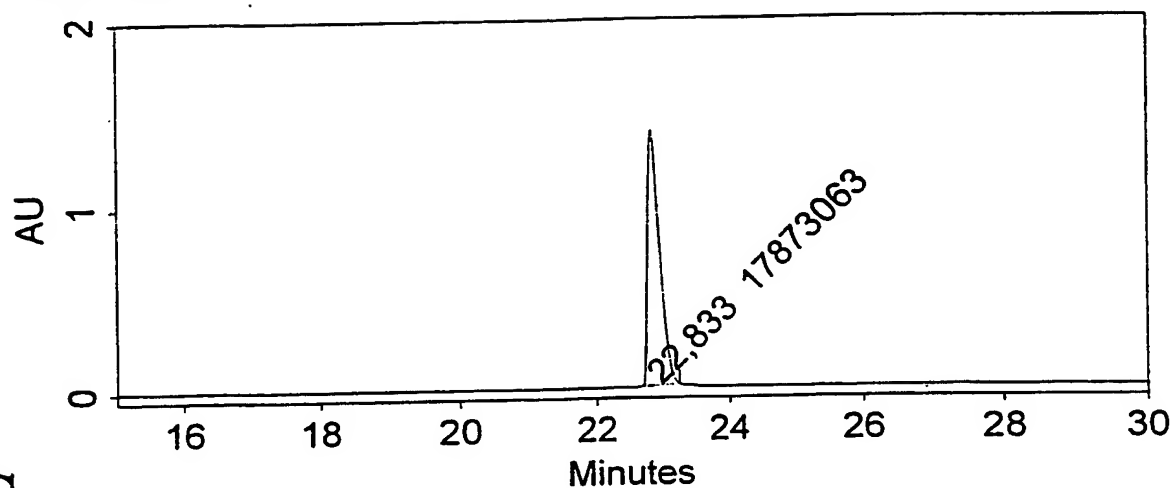
- 8/12 -

Fig. 5
(Fortsetzung)

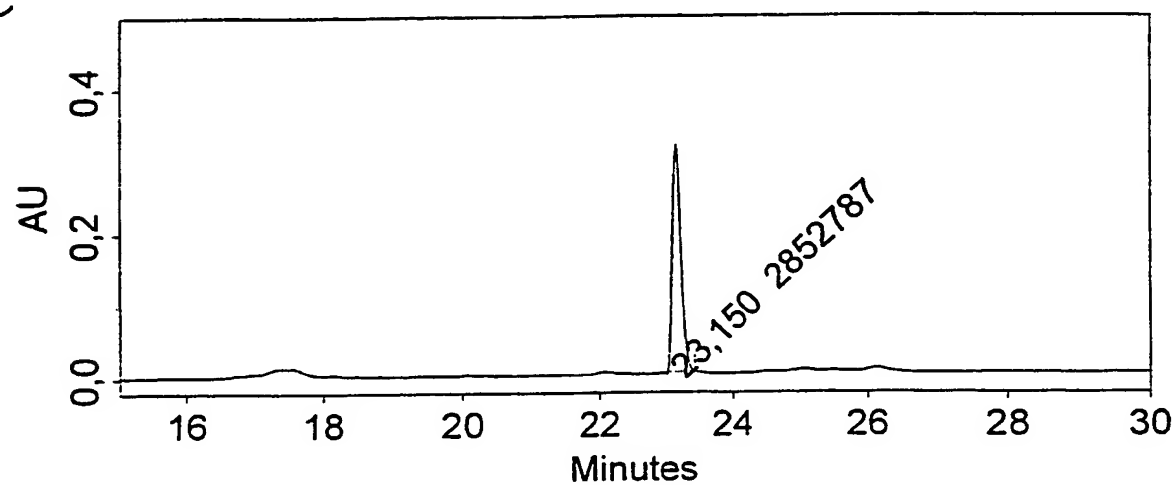


- 9/12 -

Fig. 5
(Fortsetzung)

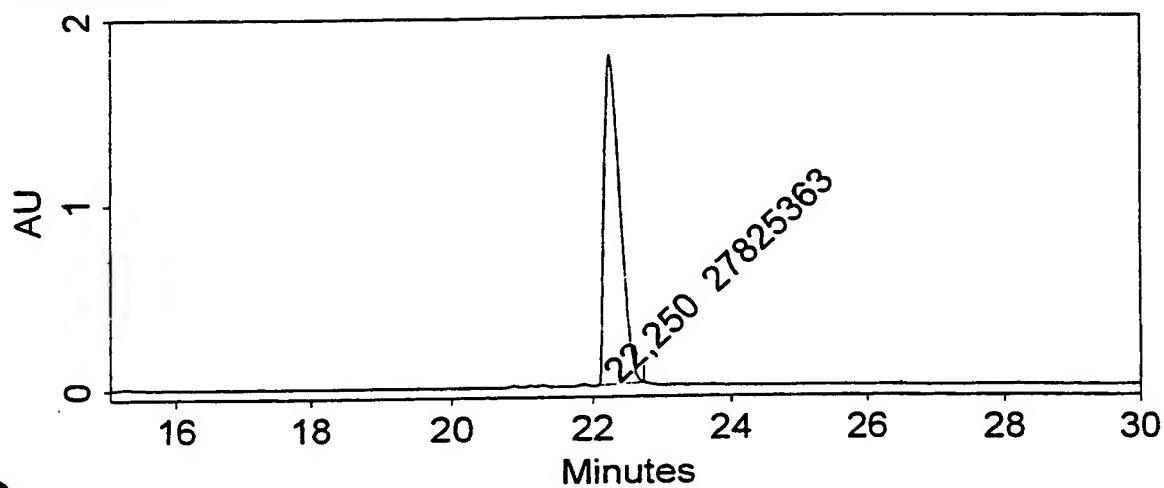
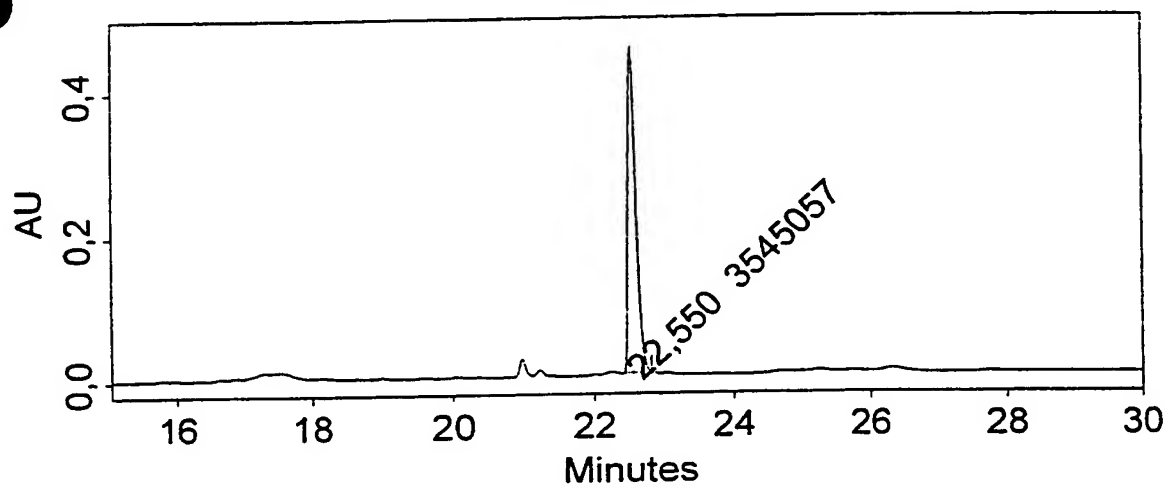


C



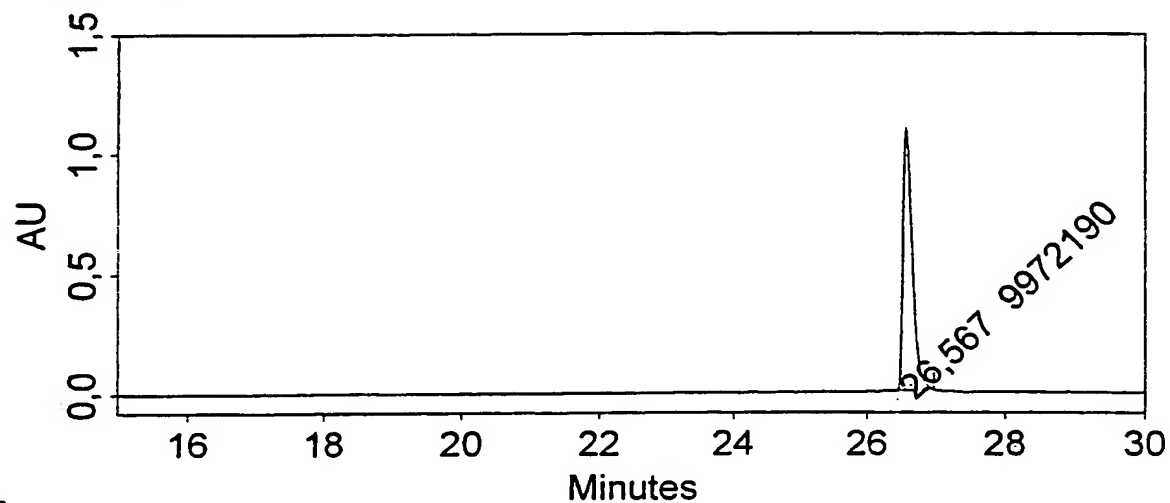
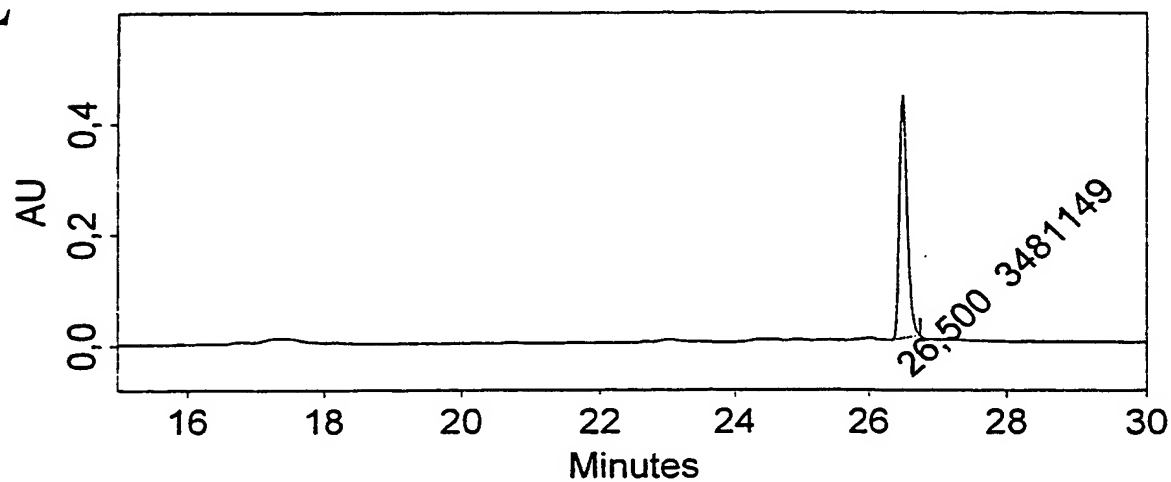
- 10/12 -

Fig. 5
(Fortsetzung)

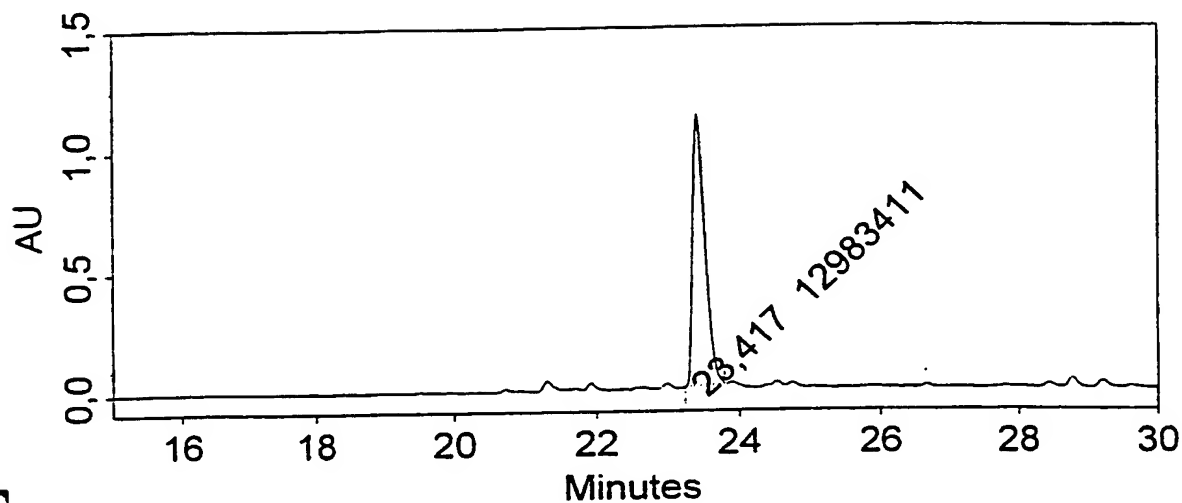
**D**

- 11/12 -

Fig. 5
(Fortsetzung)

**E**

- 12/12 -

Fig. 5
(Fortsetzung)**F**